

การตรวจ trimethylamine N-oxide (TMAO) ในซีรัมเพื่อทำนายภาวะหลอดเลือดแข็งตัวในผู้ป่วย
โรคไตเรื้อรัง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์และวิทยาภูมิคุ้มกัน ภาควิชาเวช
ศาสตร์การธนาคารเลือดและจุลชีววิทยาคลินิก
คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2563
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Serum trimethylamine N-oxide (TMAO) for prediction of atherosclerosis in patients
with chronic kidney disease



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Molecular Science of Medical Microbiology and
Immunology

Department of Transfusion Medicine and Clinical Microbiology

FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES

Chulalongkorn University

Academic Year 2020

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การตรวจ trimethylamine N-oxide (TMAO) ในซีรัมเพื่อ
	ทำนายภาวะหลอดเลือดแข็งตัวในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง
โดย	นายสมพงศ์ บุญให้
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ระดับโมเลกุลทางจุลชีววิทยาทางการแพทย์
	และวิทยาภูมิคุ้มกัน
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์อัษฎาศดิ์ ลีหวนิชกุล

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณะบดีคณะสหเวชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.ปาลณี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปาหนัน รัฐวงศ์จิรกุล)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์อัษฎาศดิ์ ลีหวนิชกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร.เมธี ศรีประพันธ์)

6176756137 : MAJOR MOLECULAR SCIENCE OF MEDICAL MICROBIOLOGY AND IMMUNOLOGY

KEYWORD: Chronic kidney disease, TMAO, TMAO reductase, Atherosclerosis, Gut leakage

Sompong Boonhai : Serum trimethylamine N-oxide (TMAO) for prediction of atherosclerosis in patients with chronic kidney disease. Advisor: Assoc. Prof. ASADA LEELAHAVANICHKUL, M.D.

Background: Increased trimethylamine N-oxide (TMAO), a gut-derived uremic toxin, in chronic kidney disease (CKD) might enhance production of TMAO reductase, a TMAO-neutralizing enzyme in gut bacteria, that probably be transferred into blood circulation during gut permeability defect (gut leakage) and may be used as a predictor of atherosclerosis.

Objective: To explore the correlation between serum TMAO, serum TMAO reductase, gut leakage systemic inflammation and atherosclerosis in CKD.

Methods: Cross-sectional analyzes were performed on blood samples from patients with chronic kidney disease (n = 48) and samples of healthy subjects were used for control (n = 20). Liver function was measured (serum glutamic-oxaloacetic transaminase; SGOT and serum glutamate-pyruvate transaminase; SGPT). Analysis of uremia toxin, including small molecules (BUN and creatinine), intermediate molecules (beta-2 microglobulin; B2M) and protein-binding molecules (serum TMAO). Detect gut leakage (serum LPS and serum TMAO reductase). Detect inflammatory response (serum C-reactive protein, serum TNF- α and serum IL-6) and assessing atherosclerosis using the index ankle-brachial index (ABI) and cardio-ankle vascular index (CAVI).

Results: In patients, both serum TMAO and serum TMAO reductase levels, as well as total levels of uremia toxin and inflammatory response, were greater than in the control group. In addition, endotoxemia was detected in 12 cases, accounting for 25% of the patients, but no association with inflammatory response and atherosclerosis.

Conclusions: Serum TMAO and serum TMAO reductase were significantly increased in patients compared to the healthy control group ($p < 0.05$), but no association with atherosclerosis was observed. In addition, serum TMAO reductase in patients with chronic kidney disease was not associated with serum TMAO, endotoxemia, and inflammatory response. Demonstrates limitation of serum TMAO reductase on hemodialysis patients. Additional studies in ESRD prior to hemodialysis are of interest.

Field of Study: Molecular Science of Medical
Microbiology and Immunology

Student's Signature

Academic Year: 2020

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความสะดวกตากรุณา ช่วยเหลือ แนะนำให้คำปรึกษา ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่เป็นอย่างดี จากอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.นพ. อัมภาศ์ ลีฬหวนิชกุล อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่ได้มอบโอกาสและทุนการศึกษา ให้ผู้เขียนได้มาเรียนในครั้งนี้ เพื่อนำความรู้ที่ได้มาช่วยพัฒนาศักยภาพขององค์กรต่อไป

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และญาติพี่น้องทุกคนที่ช่วยเหลือสนับสนุนในด้านกำลังใจด้วยดีตลอดมา นอกจากนี้ยังมีผู้ที่ให้ความร่วมมือช่วยเหลืออีกหลายท่าน ซึ่งผู้เขียนไม่สามารถกล่าวนามในที่นี้ได้หมด จึงขอขอบคุณทุกท่านเหล่านั้นไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

คุณค่าทั้งหลายที่ได้รับจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้เขียนขอมอบเป็นกตัญญูแก่เวทีแต่บิดามารดา และบูรพาจารย์ที่เคยอบรมสั่งสอน รวมทั้งผู้มีพระคุณทุกท่าน

สมพงษ์ บุญให้



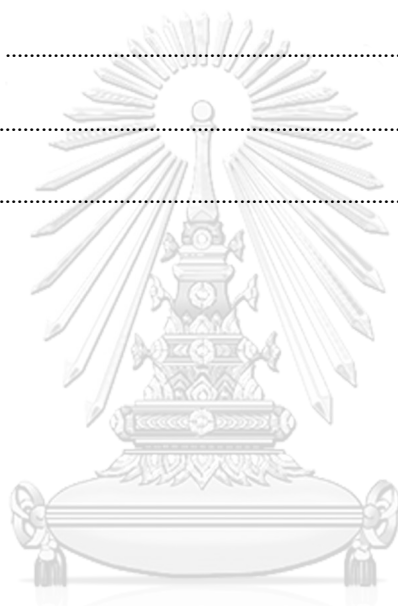
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
2. กรอบแนวคิดการวิจัย	3
3. คำถามของการวิจัย	4
4. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	4
5. สมมติฐาน.....	4
6. ขอบเขตของงานวิจัย.....	4
7. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
1. โรคไตเรื้อรัง.....	5
2. ภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว	13
3. การตรวจประเมินหลอดเลือดแดงด้วยวิธี cardio-ankle vascular index	18
4. Trimethylamine N-oxide (TMAO).....	19
5. โฟมเซลล์ (foam cells) และ TMAO	21
6. ข้อบกพร่องในการซึมผ่านของลำไส้ (gut leakage) และ TMAO reductase.....	23

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	25
1. ระเบียบวิธีวิจัย	25
2. การพิจารณารับรองจริยธรรม	26
3. ประชากรและลักษณะกลุ่มตัวอย่าง.....	26
4. วิธีการศึกษาวิจัย	27
5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	36
บทที่ 4 ผลการทดลอง	37
1. ข้อมูลผู้ป่วย	37
2. ผลการวิเคราะห์ serum TMAO.....	39
3. ผลการวิเคราะห์ความแข็งตัวของหลอดเลือดด้วยหลักการ ABI และ CAVI.....	42
4. ผลการวิเคราะห์ serum TMAO reductase.....	42
5. ผลการตรวจวิเคราะห์ serum LPS.....	44
6. ผลการตรวจวิเคราะห์ serum cytokine (serum IL-6, serum TNF- α).....	46
7. ผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่มีภาวะ endotoxemia.....	48
8. ความสัมพันธ์ระหว่าง serum TMAO และ serum TMAO reductase	50
9. ความสัมพันธ์ระหว่าง serum TMAO, serum TMAO reductase กับการตอบสนองของ กระบวนการอักเสบและ serum LPS.....	51
10. ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะหลอดเลือดแข็งตัวกับ serum TMAO, serum TMAO reductase และ serum IL-6.....	52
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย.....	54
1. กลุ่มตัวอย่างและข้อมูลผู้ป่วย	54
2. การวิเคราะห์ serum TMAO	55
3. การวิเคราะห์ความแข็งตัวของหลอดเลือดด้วยหลักการ ABI และ CAVI.....	56
4. การวิเคราะห์ serum TMAO reductase.....	56

5. การตรวจวิเคราะห์ serum LPS.....	57
6. การตรวจวิเคราะห์ serum cytokine (serum IL-6, serum TNF- α).....	57
7. ความสัมพันธ์ระหว่าง serum TMAO และ serum TMAO reductase	58
8. ความสัมพันธ์ระหว่าง serum TMAO, serum TMAO reductase กับการตอบสนองของ กระบวนกรอักเสบในผู้ป่วยที่มีภาวะ endotoxemia	59
9. ความไม่สัมพันธ์ระหว่างภาวะหลอดเลือดแข็งตัวกับ serum TMAO, serum TMAO reductase และ serum IL-6.....	59
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง	61
บรรณานุกรม	62
ประวัติผู้เขียน	70



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงการจำแนกระยะของโรคไตเรื้อรังและระดับความเสี่ยงในการเกิดภาวะแทรกซ้อนตามระดับความรุนแรง โดยพิจารณาค่า eGFR และค่า urine albumin-to-creatinine ratio (ACR) (27).....	9
ตารางที่ 2 แสดงการคำนวณค่า eGFR ด้วยสูตร CKD-EPI (27).....	10
ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบการบำบัดทดแทนไตวิธีต่าง ๆ (28).....	12
ตารางที่ 4 แสดงการเจือจางแบบอนุกรมสามเท่าของตัวอย่างและสารมาตรฐาน endotoxin	33
ตารางที่ 5 แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง	38
ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลลักษณะของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่มีและไม่มีภาวะ endotoxemia	48

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 กรอบแนวคิดในการวิจัย	3
ภาพที่ 2 แสดงขั้นตอนการทำงานของไตในคนปกติ (10).....	6
ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างของเนฟรอนหรือหน่วยไตที่ทำหน้าที่ในการกรองของเสียออกจากเลือด และดูดกลับสารที่มีประโยชน์เข้าเลือด (10).....	7
ภาพที่ 4 แสดงหลักการในการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม (29).....	11
ภาพที่ 5 แสดงการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งที่บริเวณหัวใจหรือโรคหลอดเลือดหัวใจ (32).....	13
ภาพที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ของ TMAO ในการเกิดโรคหัวใจขาดเลือดหรือกล้ามเนื้อหัวใจตาย (38)	21
ภาพที่ 7 แสดงกลไกและความซับซ้อนของการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งตัวโดยการสะสมของ oxidized LDL จะกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครเฟจพัฒนาและเคลื่อนที่เข้ามาจับกิน LDL ได้ โดยไม่จำกัดจำนวน กลายเป็นเซลล์ที่มีไขมันสะสมอยู่เต็มเซลล์เรียกว่า โฟมเซลล์ (44).....	23
ภาพที่ 8 แสดงการตรวจวัดความยืดหยุ่นของเส้นเลือดโดยอาศัยหลักการ cardio-ankle vascular index (CAVI) (41).....	29
ภาพที่ 9 แสดงค่าปกติของ cardio-ankle vascular index (CAVI) โดยแบ่งตามเพศและช่วงอายุ ต่าง ๆ (35).....	30
ภาพที่ 10 แสดงการใช้เครื่องในการตรวจวัด CAVI ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง (35).....	30
ภาพที่ 11 อธิบายการเตรียมการเจือจางแบบอนุกรมสามเท่าของตัวอย่างทดสอบและ endotoxin standard dilutions plate, test plate และ detection plate ตามลำดับ.....	34
ภาพที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางคลินิกในเลือดระหว่างกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (n = 20) และผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง (n = 48) ตามที่กำหนดโดย 1) สภาวะของตับ SGOT และ SGPT (A, B), 2) สารพิษในปัสสาวะของโมเลกุลขนาดเล็ก (BUN และ creatinine) (C, D) และโมเลกุลขนาดกลาง (beta-2 microglobulin) (E).....	39
ภาพที่ 13 แสดงการแตกตัวของสาร TMAO (MW 76) (A) และการแตกตัวของสารมาตรฐาน d9-TMAO (MW 85) (B) เมื่อเข้าสู่ส่วนผลิตไอออน (ion source) ของเครื่อง mass spectrometer ...	40

ภาพที่ 14 แสดงตัวอย่างกราฟและข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ serum TMAO ของเครื่อง mass spectrometer รุ่น Q-TRAP API 4000 (AB SCIEX, Framingham, MA) ผ่านโปรแกรม TargetLynx™ application manager.....41

ภาพที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบ serum trimethylamine N-oxide (TMAO) ระหว่างกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (n = 20) และผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง (n = 48).....41

ภาพที่ 16 แสดงผลการวิเคราะห์ความแข็งตัวของหลอดเลือดด้วยหลักการ ABI และ CAVI (n = 32)42

ภาพที่ 17 แสดงกราฟของสารมาตรฐาน TMAO reductase ด้วยหลักการ ELISA $R^2=0.975$43

ภาพที่ 18 แสดงตัวอย่างการวิเคราะห์ serum TMAO reductase ด้วยหลักการ ELISA.....44

ภาพที่ 19 แสดงกราฟของสารมาตรฐาน LPS (standard curve) ด้วยหลักการ ELISA โดยที่สมการเชิงเส้น $y=0.0553x + 0.0785$, $R^2=0.9925$45

ภาพที่ 20 แสดงตัวอย่างการวิเคราะห์ serum LPS ด้วยหลักการ ELISA โดยใช้ฟังก์ชัน FORECAST ในโปรแกรม Microsoft excel ค่าการดูดกลืนของแสงจะแปรผันตรงกับปริมาณ serum LPS ในสิ่งส่งตรวจโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน45

ภาพที่ 21 แสดงกราฟของสารมาตรฐาน IL-6 ด้วยหลักการ ELISA โดยที่สมการเชิงเส้น $y=0.0106x + 0.0231$, $R^2=0.9855$46

ภาพที่ 22 แสดงกราฟของสารมาตรฐาน TNF- α ด้วยหลักการ ELISA โดยที่สมการเชิงเส้น $y=0.0011x + 0.0044$, $R^2=0.9985$46

ภาพที่ 23 แสดงตัวอย่างการวิเคราะห์ serum IL-6 ด้วยหลักการ ELISA โดยใช้ฟังก์ชัน FORECAST ในโปรแกรม Microsoft excel ค่าการดูดกลืนของแสงจะแปรผันตรงกับปริมาณ serum IL-6 ในสิ่งส่งตรวจ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน.....47

ภาพที่ 24 แสดงตัวอย่างการวิเคราะห์ serum TNF- α ด้วยหลักการ ELISA โดยใช้ฟังก์ชัน FORECAST ในโปรแกรม Microsoft excel ค่าการดูดกลืนของแสงจะแปรผันตรงกับปริมาณ serum TNF- α ในสิ่งส่งตรวจ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน.....47

ภาพที่ 25 แสดงการเปรียบเทียบภาวะ gut leakage และการตอบสนองของกระบวนการอักเสบในเลือดระหว่างกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (n = 20) และผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง (n = 48) ตามที่กำหนดโดย

1) gut leakage ได้แก่ serum LPS และ serum TMAO reductase (A-B) 2) การตอบสนองต่อการอักเสบโดยแสดงให้เห็นถึง serum CRP, serum TNF- α และ serum IL-6 (C-E).....50

ภาพที่ 26 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่าง serum TMAO กับ serum TMAO reductase ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง (n = 48) โดยค่าการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ $R^2=0.014$, $p=0.485$51

ภาพที่ 27 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่าง serum TMAO reductase หรือ serum TMAO กับการตอบสนองของการอักเสบ (serum IL-6) $R^2=0.247$, $p=0.050$ และ $R^2=0.0747$, $p=0.069$ ตามลำดับ (A, B) และ endotoxemia $R^2=0.025$, $p=0.744$ และ $R^2=0.0009$, $p=0.845$ ตามลำดับ (C, D) ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง (n = 48).....52

ภาพที่ 28 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่าง serum TMAO, serum TMAO reductase หรือ serum IL-6 เทียบกับภาวะหลอดเลือดแข็งตัว โดยใช้ดัชนีหลอดเลือดข้อเท้าถึงข้อเท้า (ABI) $R^2=0.1443$, 0.0143 , 0.3426 ตามลำดับ (A-C) และดัชนีหลอดเลือดข้อเท้าถึงหัวใจ (CAVI) $R^2=0.1386$, 0.0001 , 0.0024 ตามลำดับ (D-F) (n = 32).....53

ภาพที่ 29 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าควอไทล์สูงสุดของ serum TMAO, serum TMAO reductase และ serum IL-6 เทียบกับภาวะหลอดเลือดแข็งตัว โดยใช้ดัชนีหลอดเลือดข้อเท้าถึงข้อเท้า (ABI) $R^2=0.0172$, 0.1357 , 0.382 ตามลำดับ (A-C) และดัชนีหลอดเลือดข้อเท้าถึงหัวใจ (CAVI) $R^2=0.0292$, 0.002 , 0.365 ตามลำดับ (D-F) (n = 8).....53

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

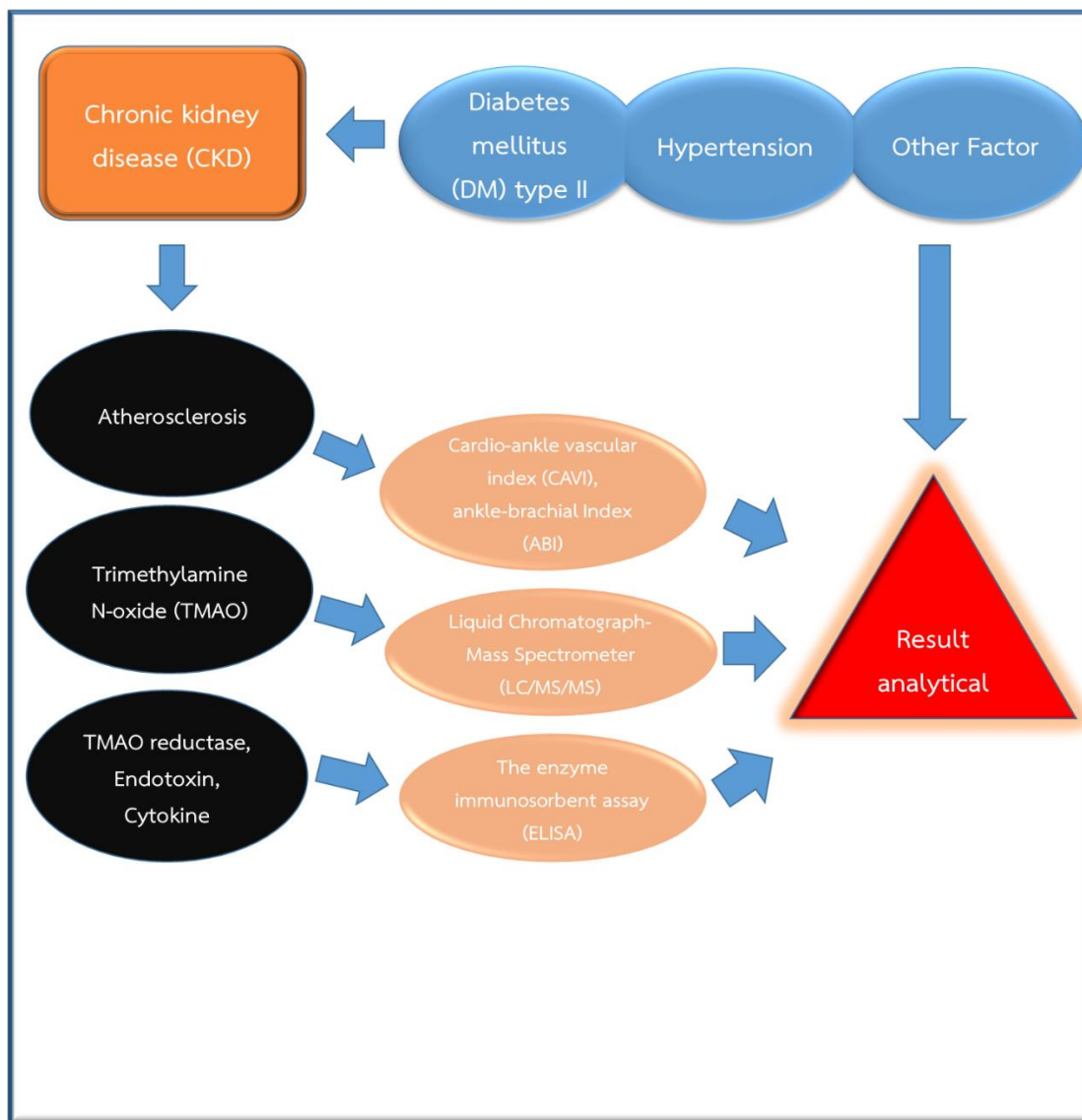
โรคไตเรื้อรังเป็นปัญหาที่สำคัญทางสาธารณสุขทั่วโลก รวมถึงในประเทศไทย (1) โรคไตอาจเกิดจากสาเหตุที่ไตโดยตรง หรือจากโรคประจำตัวของผู้ป่วย เช่น โรคเบาหวาน หรือความดันโลหิตสูง หากผู้ป่วยไม่ตอบสนองต่อการรักษา หรือไม่ได้รับการรักษาที่เหมาะสมจะทำให้การทำงานของไตเสื่อมลงจนเกิดโรคไตเรื้อรัง และหากไม่สามารถชะลอการเสื่อมหน้าที่ของไตได้ก็จะทำให้กลายเป็นโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (2) โดยการทำงานของไตจะลดลงจนกระทั่งอัตราการกรองของไต (estimated glomerular filtration rate; eGFR) น้อยกว่า 15 มิลลิลิตรต่อนาทีต่อ 1.73 ตารางเมตร จัดว่าเป็นไตวายระยะสุดท้าย (end stage renal disease; ESRD) ผู้ป่วยกลุ่มดังกล่าวจำเป็นต้องได้รับการบำบัดทดแทนไต (renal replacement therapy; RRT) (3) ได้แก่ การฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม (hemodialysis) การล้างไตทางหน้าท้อง (peritoneal dialysis) หรือการผ่าตัดปลูกถ่ายไต (kidney transplantation) ซึ่งมีจำนวนผู้ป่วยเพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็วในปัจจุบัน และมีการรักษาที่ยุ่งยาก มีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก (4) ประเทศไทยมีจำนวนผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้ายเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจาก 419.9 คนต่อล้านประชากร ในปี พ.ศ. 2550 เป็น 1,199 คนต่อล้านประชากร ในปี พ.ศ. 2557 (5) แม้ว่าการบำบัดทดแทนไตจะทำให้ผู้ป่วยเสมือนมีไตทำงานได้ใกล้เคียงคนปกติ โดยสามารถทำหน้าที่ของไตในการกำจัดของเสีย ควบคุมสมดุลน้ำและอิเล็กโทรไลต์ รวมถึงการสร้างฮอร์โมนต่าง ๆ การบำบัดทดแทนไตในแต่ละวิธีล้วนมีข้อจำกัด (6) เช่น การเกิดอาการไม่พึงประสงค์ที่สัมพันธ์กับการบำบัดทดแทนไต ผู้ป่วยบางรายมีความดันโลหิตต่ำลงหรือเกิดอาการในระบบหัวใจและหลอดเลือดขณะฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม (7) ผลการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการที่ถูกต้องจึงมีส่วนช่วยในการทำนายและติดตามการรักษาโรคหลอดเลือดจะป้องกันการเสียชีวิตของผู้ป่วยได้

ปัจจุบันเริ่มมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับบทบาทของ trimethylamine N-oxide (TMAO) ที่มีความสัมพันธ์กับการแข็งตัวของหลอดเลือด Stanley Hazen และคณะนักวิจัยแห่ง Cleveland clinic lerner research institute ในรัฐโอไฮโอ สหรัฐอเมริกา (8) ค้นพบว่า การให้หนูทดลองรับประทานคาร์นิทีน (carnitine) ซึ่งเป็นสารที่มีมากในเนื้อแดงและเครื่องดื่มบำรุงกำลัง จะทำให้เส้นเลือดแดงหนาและแข็งตัวขึ้น (atherosclerosis) เพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจ เนื้อแดงมีสารคาร์นิทีนที่แบคทีเรียในกระเพาะใช้เป็นอาหารและสร้างไขมันเลว (low density lipoprotein; LDL) เป็นบ่อเกิดโรคเส้นเลือดหัวใจตีบ (9) ทั้งนี้ นักวิจัยได้ทดลองป้อนสารคาร์นิทีนให้แก่หนูทดลองอีกกลุ่ม

หนึ่งที่ทำให้ยาฆ่าแบคทีเรียไว้ หนูกลุ่มนี้จะไม่เกิดเส้นเลือดตีบ สภาวะดังกล่าวสามารถพบได้ในร่างกายของคน โดยกลุ่มคนที่มีระดับคาร์นิทีนในเลือดสูงมีความเสี่ยงที่จะเป็นโรคหัวใจมากกว่าคนปกติ เนื่องมาจากแบคทีเรียบางชนิดที่อยู่ในทางเดินอาหารใช้คาร์นิทีนเป็นแหล่งพลังงาน สามารถย่อยสลายคาร์นิทีนและเกิดเป็นของเสียที่ชื่อ trimethylamine (TMA) ซึ่งตัวของคนจะเปลี่ยนแปลงสาร TMA นี้ให้กลายเป็นสารอีกตัวที่ชื่อ trimethylamine-N-oxide (TMAO) แล้วกรองผ่านไต (8) นอกจากนี้สาร TMAO ยังเป็นตัวการสำคัญที่เร่งให้แมคโครเฟจกักเก็บไขมันเลวมากขึ้น และสะสมไว้ไม่ถูกทำลาย ทำให้ภายในเซลล์เต็มไปด้วยก้อนไขมันเกิดลักษณะที่เรียกว่าโฟมเซลล์ (foam cells) ซึ่งเป็นสัญญาณแรกเริ่มของโรคหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดแดงแข็ง ก่อให้เกิดการจับหนาตัวขึ้นภายในผนังหลอดเลือดแดง เกิดเป็นภาวะหลอดเลือดแข็งตัวที่เป็นต้นเหตุของโรคหัวใจ (8,9)

การศึกษาวิจัยในโครงการนี้ เป็นการศึกษาความสัมพันธ์ของ TMAO และปัจจัยต่าง ๆ ที่ส่งผลกระทบต่อการแข็งตัวของหลอดเลือดในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังชาวไทย ซึ่งไม่เคยมีการศึกษามาก่อน โดยการตรวจ TMAO ในห้องปฏิบัติการทั่วไปทำได้ยาก เนื่องจากมีขั้นตอนการทดสอบยุ่งยาก ผู้ปฏิบัติงานต้องมีความชำนาญ และต้องใช้เครื่องมือ mass spectrometer ในการตรวจวิเคราะห์ โดยผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังจะสูญเสียการทำหน้าที่ของไตจนไม่สามารถขับสาร TMAO ออกจากร่างกายได้ การทราบความสัมพันธ์ที่แน่ชัดของสาร TMAO และปัจจัยต่าง ๆ ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการแข็งตัวของหลอดเลือดในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังชาวไทย ช่วยเป็นตัวบ่งชี้ในการพยากรณ์โรคและนำไปพัฒนาเป็น biomarker ในการตรวจวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และโรงพยาบาลต่าง ๆ ที่มีผู้ป่วยโรคไต ซึ่งช่วยให้แพทย์ใช้ประกอบการวินิจฉัยและปรับการรักษา ส่งเสริมการป้องกันโรค ให้เหมาะสมกับคนไข้ต่อไปในอนาคต

2. กรอบแนวคิดการวิจัย



ภาพที่ 1 กรอบแนวคิดในการวิจัย

3. คำถามของการวิจัย

ระดับของ serum TMAO และ serum TMAO reductase ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีความสัมพันธ์กับภาวะหลอดเลือดแข็งตัวและระบบการอักเสบหรือไม่

4. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ serum TMAO, serum TMAO reductase และสถานะการแข็งตัวของหลอดเลือดของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่มีการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียมอย่างต่อเนื่อง

5. สมมติฐาน

ระดับของ serum TMAO และ serum TMAO reductase ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีความสัมพันธ์กับสถานะการแข็งตัวของหลอดเลือดและสามารถนำไปเป็น biomarker ในห้องปฏิบัติการได้

6. ขอบเขตของงานวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาวิจัยนำร่อง (pilot study) เนื่องด้วยเหตุผลทางด้านงบประมาณในการทำวิจัยที่ต้องใช้เงินจำนวนมาก จึงมีการปรับใช้ตัวอย่างที่ศึกษาจำนวน 48 ตัวอย่างจากการคำนวณทั้งหมด 114 ตัวอย่าง ซึ่งเกณฑ์การคัดเลือกจะกล่าวไว้ในหัวข้อประชากรและลักษณะกลุ่มตัวอย่าง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณและความสัมพันธ์ระหว่างระดับของ serum TMAO, serum TMAO reductase และสถานะการแข็งตัวของหลอดเลือดของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่มีการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียมอย่างต่อเนื่อง และได้ทำการเก็บตัวอย่างซีรัมปริมาตร 2 มิลลิลิตรจากผู้ป่วยหลังได้รับการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม ระหว่างเดือนมกราคม - พฤษภาคม พ.ศ. 2562

7. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

เกิดองค์ความรู้ใหม่ที่สามารถนำไปเป็นตัวบ่งชี้ภาวะหลอดเลือดแข็งตัวในการตรวจทางห้องปฏิบัติการได้ เพื่อทำนายและติดตามผลการรักษาผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่มีการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียมอย่างต่อเนื่อง และใช้ประกอบการวินิจฉัยของแพทย์ในการปรับการรักษาให้เข้ากับผู้ป่วยต่อไปในอนาคต

บทที่ 2

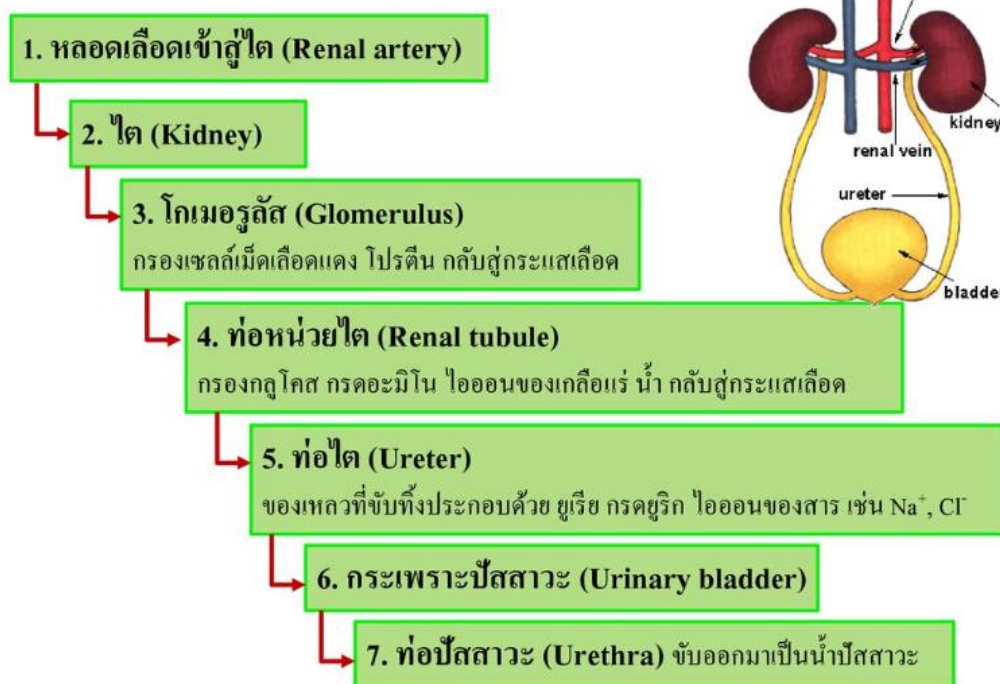
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. โรคไตเรื้อรัง

1.1 สรีรวิทยาและการทำหน้าที่ของไต

ไตเป็นอวัยวะที่มีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่ว คนปกติมีไต 2 ข้าง วางอยู่บริเวณกลางหลังข้างละ 1 อัน โดยตั้งอยู่บริเวณด้านหลังไตต่อกระดูกชายโครงบริเวณบั้นเอว (10) ไตเปรียบเสมือนเครื่องกรองชนิดพิเศษที่มีความมหัศจรรย์และจำเป็นอย่างมากในการดำรงชีวิต ไตรับเลือดจากหลอดเลือดแดงไต และเทเข้าสู่หลอดเลือดดำไต ไตแต่ละข้างขับปัสสาวะสู่ท่อไต อันเป็นโครงสร้างคู่และเทเข้าสู่กระเพาะปัสสาวะซึ่งมีหน้าที่ควบคุมความสำคัญหลายอย่าง ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ไตทำหน้าที่กลั่นกรองน้ำ เกลือแร่ และสารเคมีส่วนเกินที่ร่างกายไม่ต้องการ พร้อมทั้งทำการคัดหลั่งของเสียออกจากร่างกาย ไตเป็นอวัยวะสำคัญในระบบปัสสาวะและยังมีหน้าที่อ้ารงดุล (11) เช่น การกำกับอิเล็กโทรไลต์ การรักษาสมดุลกรด-เบส และการกำกับความดันเลือดผ่านการรักษาสมดุลเกลือและน้ำ ไตทำหน้าที่เป็นตัวกรองเลือดตามธรรมชาติ และนำของเสียที่ละลายได้ในน้ำออก ซึ่งจะถูกส่งไปยังกระเพาะปัสสาวะ ในการผลิตปัสสาวะ ดังแสดงในภาพที่ 2 ไตขับของเสีย เช่น ยูเรียและแอมโมเนีย และยังทำหน้าที่ดูดกลับ น้ำ กลูโคสและกรดอะมิโน ไตผลิตฮอร์โมน เช่น แคลซิโตรอล อิรีโทรพอยติน และเอนไซม์เรนิน ซึ่งเรนินออกฤทธิ์ต่อไตโดย rennin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) เป็นระบบที่สำคัญในการควบคุมการทำงานของไต ควบคุมความดันโลหิต หัวใจและหลอดเลือด โดย renin-angiotensin system ซึ่งเป็นการทำงานร่วมกันของระบบฮอร์โมนหลายตัว เมื่อความดันโลหิตต่ำลง เซลล์พิเศษในไตจะตรวจพบการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว พร้อมกับปล่อยสารที่เรียกว่า เรนิน ออกสู่กระแสเลือดเพื่อทำการเปลี่ยน angiotensin ซึ่งเป็นสารที่ไม่ออกฤทธิ์ให้กลายเป็น angiotensin I สาร angiotensin I นี้จะทำให้เกิดเปลี่ยนแปลงระดับความดันได้มากขึ้น เมื่อมันถูกเปลี่ยนให้เป็น angiotensin II ซึ่งจะเกิดขึ้นในปอด โดยผ่านกระบวนการทำงานของ angiotensin converting enzyme (ACE) โดยที่ angiotensin II เป็นฮอร์โมนออกฤทธิ์ที่เส้นเลือดโดยตรง ทำให้ความดันโลหิตสูงขึ้น นอกจากนั้นยังมีหน้าที่สำคัญอีกอย่างหนึ่ง คือกระตุ้นให้ปล่อยสาร aldosterone ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ทำให้เส้นเลือดเกิดการหดตัว (vasoconstrictors) ทำให้ความดันโลหิตเพิ่มสูงขึ้นได้อย่างมากและในขณะเดียวกัน aldosterone จะมีผลกระหนาบต่อการกรองเลือดของไต โดยที่ aldosterone จะออกฤทธิ์ทำให้ไตเก็บกักทั้งเกลือและน้ำเอาไว้ ไม่ให้มันถูกขับออกจากร่างกายนำมาซึ่งการเกิดภาวะความดันโลหิตสูง (12)

การทำงานของไต



ภาพที่ 2 แสดงขั้นตอนการทำงานของไตในคนปกติ (10)

โดยสรุปหน้าที่ของไต ดังต่อไปนี้

1. สร้างน้ำปัสสาวะซึ่งเกิดจากการกรองเลือดที่ไต โดยของเสียส่วนใหญ่เป็นของเสียที่เกิดจากขบวนการเมตาโบลิซึมของเซลล์ (11)

2. เกี่ยวข้องกับการควบคุมสมดุลของน้ำในร่างกาย เนื่องจากการขับถ่ายปัสสาวะทำให้ร่างกายสูญเสียน้ำ ซึ่งเป็นส่วนประกอบส่วนใหญ่ในน้ำปัสสาวะ และเป็นตัวทำลายสำหรับสารต่าง ๆ เช่น ยูเรีย (urea) และ ครีเอทีน (creatinine) ที่เป็นของเสียจากขบวนการเมตาโบลิซึมที่ร่างกายต้องการขับออก ไตจึงเป็นตัวควบคุมปริมาณน้ำในร่างกายไม่ให้มีการขับน้ำออกมากเกินไป โดยการควบคุมของฮอร์โมนแอนตี้ไดยูเรติกฮอร์โมน หรือ เอดีเอช (antidiuretic hormone; ADH) ที่สังเคราะห์จากต่อมใต้สมองส่วนหน้า และอัลโดสเตอโรน (aldosterone) ที่สังเคราะห์จากต่อมหมวกไตส่วนนอก (12)

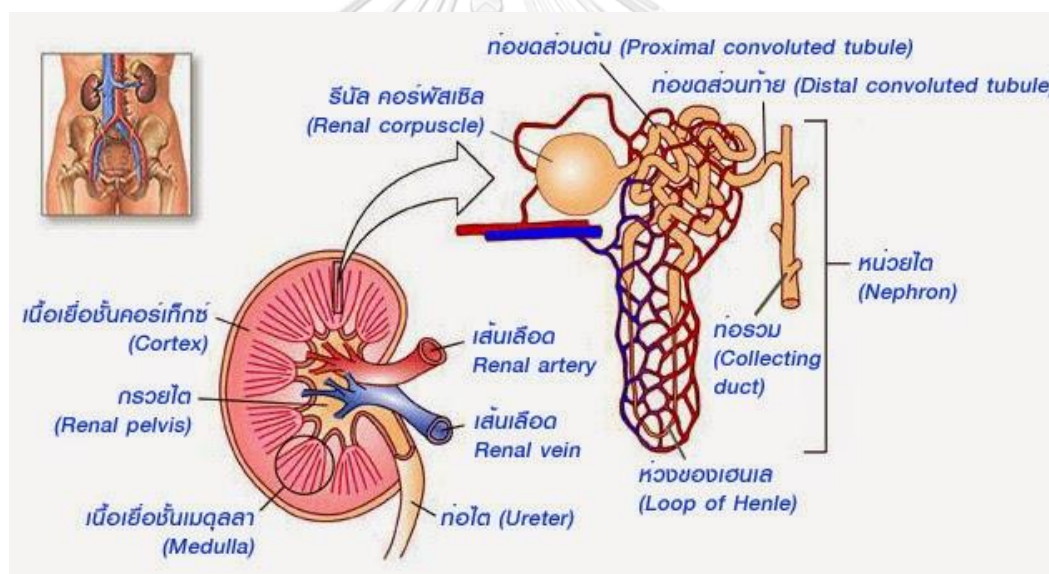
3. ควบคุมสมดุลของกรด-ด่างในร่างกาย ด้วยการควบคุมสมดุลของกรด-ด่างในน้ำเลือด โดยทั่วไปในเลือดมีค่า pH ประมาณ 7.4 ซึ่งเป็นระดับที่เซลล์ในร่างกายสามารถทำหน้าที่ได้อย่างปกติ แต่การที่เลือดมี pH เป็นต่างมากเกินไป (alkalosis) หรือ มี pH เป็นกรดมากเกินไป (acidosis) จะมีผลให้การทำงานของเซลล์มีประสิทธิภาพลดลง (11)

4. ควบคุมสมดุลของเกลือแร่ในร่างกาย (electrolyte balance) โดยการขับแร่ธาตุส่วนที่มีมากเกินไปความต้องการออก และดูดกลับแร่ธาตุส่วนที่ร่างกายมีความต้องการกลับเข้าสู่ร่างกายผ่านทางหลอดเลือด (11)

5. สังเคราะห์และหลั่งฮอร์โมนอีริโทรโพอิติน (erythropoietin) ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลล์เม็ดเลือดแดง (erythropoiesis) และฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมความดันของเลือด คือ ฮอร์โมนเรนิน (renin) (12)

6. เกี่ยวกับการทำลายสารพิษ (detoxification) เพื่อช่วยกำจัดสารพิษในร่างกาย โดยการเปลี่ยนสารพิษบางชนิดให้เป็นสารที่มีพิษน้อยลง หรือเปลี่ยนให้เป็นสารที่ไม่มีพิษแล้วขับออกจากร่างกาย (11)

7. ทำหน้าที่ผลิตวิตามินดีที่ทำงานได้ (active vitamin D) เพื่อช่วยในการดูดซึมแคลเซียม อีออนที่ผนังลำไส้เล็ก (11)



ภาพที่ 3 แสดงโครงสร้างของเนฟรอนหรือหน่วยไตที่ทำหน้าที่ในการกรองของเสียออกจากเลือด และดูดกลับสารที่มีประโยชน์เข้าเลือด (10)

1.2 การจำแนกระยะของโรคไตเรื้อรัง

โรคของไตมีหลากหลาย ปัญหาทางคลินิกเกี่ยวกับไตที่พบบ่อย ได้แก่ กลุ่มอาการไตอักเสบ (nephritic และ nephrotic) ภาวะไตโต ภาวะไตบวม ภาวะไตอักเสบเรื้อรัง การติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ โรคนี้วัด และการอุดตันทางเดินปัสสาวะ (11) มะเร็งของไตมีหลายอย่าง มะเร็งของไตในผู้ใหญ่ที่พบบ่อยที่สุด ได้แก่ มะเร็งเซลล์ไต มะเร็งถุงน้ำ และปัญหาของไตบางอย่างสามารถรักษาได้ด้วยการตัดไต

เมื่อการทำหน้าที่ของไตซึ่งวัดได้โดยใช้อัตราการกรองของโกลเมอรูลัส (glomerular filtration rate) ต่ำอย่างต่อเนื่อง การแยกสารผ่านเยื่อและการปลูกถ่ายไตอาจเป็นทางเลือกการรักษา นีวไนไตปกติไม่เป็นอันตราย แต่อาจทำให้เกิดการปวด และการเกิดนิ่วซ้ำ ๆ เรื้อรังสามารถทำให้ไตเกิดแผลเป็น การนำนิ่วไนไตออกเกี่ยวข้องข้องกับการรักษาด้วยอัลตราซาวด์เพื่อสลายนิ่วเป็นชิ้นที่เล็กลง ซึ่งจะผ่านทางเดินปัสสาวะ กลุ่มอาการทั่วไปของนิ่วไนไต คือ การปวดแปลบ (sharp) ถึงปวดจนรบกวนการใช้ชีวิต (disabling pain) ในตอนกลางหรือข้างของหลังส่วนล่าง (10,11)

โรคไตหมายถึงการที่ไตถูกทำลายและสูญเสียความสามารถการทำหน้าที่ในการกรองเลือดได้น้อยลง (น้อยกว่า 15 มิลลิลิตรต่อนาทีต่อ 1.73 ตารางเมตร) ซึ่งการจะหาค่านี้ได้ขึ้นอยู่กับการทำงานของไต สาเหตุที่ทำให้เกิดโรคไตมี 2 สาเหตุที่พบได้บ่อย คือ 1) โรคเบาหวาน หมายถึงภาวะที่มีน้ำตาลในเลือดในระดับสูงเกินไป และทำลายอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกาย เช่น ไต หัวใจ เส้นเลือด ตา และเส้นประสาทต่าง ๆ ซึ่งส่งผลทำให้หน่วยของไตเสื่อมลง (13) 2) ความดันโลหิตสูง หมายถึงภาวะที่ความดันของเลือดที่มีต่อผนังเส้นเลือดสูงขึ้น หากไม่ได้รับการควบคุม หรือควบคุมได้ไม่ดี ความดันโลหิตสูงจะสามารถนำไปสู่โรคไตเรื้อรัง โรคหัวใจ และอัมพาตได้ ในอีกทางหนึ่งโรคไตเรื้อรังยังสามารถก่อให้เกิดความดันโลหิตสูงได้เช่นกัน (14) สภาวะอื่น ๆ ก็สามารถทำให้เกิดโรคไตเรื้อรังได้ เช่น ไตอักเสบ (glomerulonephritis) หรือ โรคทางพันธุกรรม อย่างเช่น โรคถุงน้ำในไต (polycystic kidney disease) ส่วนสาเหตุอื่น ๆ ที่อาจพบได้คือ กรวยไตอักเสบ ภาวะกลุ่มเส้นเลือดฝอยของไต อักเสบ โรคไตเป็นถุงน้ำ ได้รับสารพิษ การใช้ยาบางประเภทเป็นเวลานาน เช่น aspirin หรือ Ibuprofen สารพิษที่เกิดจากยาหรือการ X-ray โรคที่เกิดในระบบต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น Systemic lupus erythematosus (SLE), Polyarteritis ภาวะต่าง ๆ ที่มีผลทำให้มีการหมุนเวียนของกระแสโลหิตลดลง เช่น โลหิตเป็นพิษ หัวใจวาย โรคตับ หรือช็อค เป็นต้น (15,16) การเป็นโรคไตเรื้อรังจะเพิ่มความเสี่ยงในการเสียชีวิตก่อนวัยอันควร เนื่องจากผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีแนวโน้มที่จะเป็นโรคหัวใจหรือเกี่ยวกับหลอดเลือดหัวใจได้ง่าย ซึ่งนับเป็นสาเหตุอันดับหนึ่งของการเสียชีวิตของผู้ป่วยโรคไต ชาวอเมริกันมากกว่า 20 ล้านคน (17,18) และคนไทยประมาณ 1.5 ล้านคน (16) กำลังเป็นโรคไตเรื้อรัง และส่วนใหญ่ไม่ทราบว่าตัวเองกำลังเป็นโรคเนื่องจากไม่มีอาการแสดง การตรวจพบและรักษาแต่เนิ่น ๆ สามารถช่วยไม่ให้โรคไตมีอาการแย่ลงได้ และช่วยป้องกันโรคแทรกซ้อน เช่น ไตวาย โรคหัวใจ และการเสียชีวิตก่อนวัยอันควร (19,20)

ผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง หมายถึง ผู้ป่วยที่มีภาวะไตผิดปกติของโครงสร้างหรือหน้าที่การทำงานของไตนานติดต่อกันเกิน 3 เดือน (21) ทั้งนี้ผู้ป่วยอาจจะมีค่าอัตราการกรองของไต (estimate glomerular filtration rate; eGFR) ผิดปกติหรือไม่ก็ได้ เกณฑ์การวินิจฉัยโรคไตเรื้อรัง โดยมีลักษณะอย่างใดอย่างหนึ่งใน 2 ข้อต่อไปนี้ ได้แก่ 1) ผู้ป่วยมีภาวะไตผิดปกติจากการตรวจพบตัวบ่งชี้การเสียหายของไต (marker of kidney damage) ตั้งแต่ 1 ข้อขึ้นไป (22) เป็นระยะเวลาติดต่อกัน

มากกว่า 3 เดือน โดยตรวจพบอาการดังต่อไปนี้ แอลบูมินรั่วในปัสสาวะมากกว่าหรือเท่ากับ 30 มิลลิกรัมต่อ 1 วัน ตรวจพบเม็ดเลือดแดงในปัสสาวะ มีความผิดปกติของเกลือแร่ที่เกิดจากท่อไตผิดปกติ ตรวจพบความผิดปกติทางรังสีวิทยา ตรวจพบความผิดปกติทางโครงสร้างหรือพยาธิสภาพ และมีประวัติการได้รับผ่าตัดปลูกถ่ายไต 2) ผู้ป่วยที่มีค่า eGFR น้อยกว่า 15 มิลลิตรต่อนาทีต่อ 1.73 ตารางเมตร ติดต่อกันนานเกิน 3 เดือน (23-26) โดยอาจจะตรวจพบหรือไม่พบว่ามีภาวะไตผิดปกติก็ได้

การแบ่งระยะของโรคไตเรื้อรังสามารถแบ่งตามการประเมินการทำงานของไตโดยการใช้ค่า eGFR โดยการใช้ค่าซีรั่มครีเอตินิน (serum creatinine; Scr) ในผู้ใหญ่แนะนำให้ใช้สมการของ chronic kidney disease epidemiology collaboration equation (CKD-EPI equation) ตามคำแนะนำ The kidney disease: Improving global outcomes (KDIGO) (27) และการแบ่งระยะของโรคไตเรื้อรังสามารถแบ่งตามลำดับขั้นของอัตราการกรองของไตและแอลบูมินรั่วในปัสสาวะ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงการจำแนกระยะของโรคไตเรื้อรังและระดับความเสี่ยงในการเกิดภาวะแทรกซ้อนตามระดับความรุนแรง โดยพิจารณาค่า eGFR และค่า urine albumin-to-creatinine ratio (ACR) (27)

Prognosis of CKD by GFR and Albuminuria Categories: KDIGO 2012				ปริมาณโปรตีนแอลบูมินในปัสสาวะ (ประเมินจากค่า ACR)		
				A1	A2	A3
				ปกติ ถึง เพิ่มขึ้นเล็กน้อย < 30 mg/g < 3 mg/mmol	เพิ่มขึ้น ปานกลาง 30 - 300 mg/g 3 - 30 mg/mmol	เพิ่มขึ้น มาก > 300 mg/g > 30 mg/mmol
ค่า eGFR (มล./นาที/1.73 m ²)	G1	ปกติ หรือ สูง	≥ 90	ความเสี่ยงต่ำ*	ความเสี่ยง ปานกลาง	ความเสี่ยงสูง
	G2	ลดลงเล็กน้อย	60 - 89			
	G3a	ลดลงเล็กน้อย ถึงปานกลาง	45 - 59	ความเสี่ยงปาน กลาง	ความเสี่ยงสูง	ความเสี่ยงสูงมาก
	G3b	ลดลงปานกลาง ถึงมาก	30 - 44	ความเสี่ยงสูง		
	G4	ลดลงมาก	15 - 29	ความเสี่ยงสูงมาก		
	G5	ภาวะไตวาย	< 15		ความเสี่ยง สูงมาก	

1.3 การประเมินค่าอัตราการกรองไต

1. ผู้ที่มีความเสี่ยงสูงต่อการเป็นโรคไตเรื้อรังควรได้รับการประเมินค่า eGFR อย่างน้อยปีละ 1 ครั้ง ด้วยการตรวจค่า serum creatinine

2. ควรใช้ค่าระดับ serum creatinine ที่วัดด้วยวิธี enzymatic method เพื่อเพิ่มความแม่นยำในการประเมินค่า eGFR ในกรณีที่ไม่สามารถตรวจด้วยวิธีดังกล่าวได้ สามารถใช้ค่าระดับ serum creatinine ที่วัดด้วยวิธี modified kinetic Jaffe reaction ทดแทน
3. การรายงานผลค่าระดับ serum creatinine ควรรายงานผลเป็นค่าทศนิยม 2 ตำแหน่ง เช่น ค่า serum creatinine เท่ากับ 1.01 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร
4. คำนวณค่า eGFR ด้วยสูตร CKD-EPI ดังแสดงในตารางที่ 2

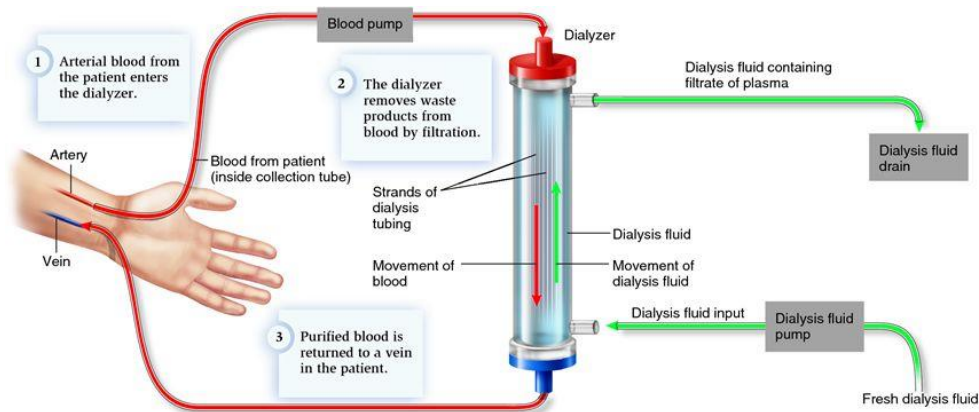
ตารางที่ 2 แสดงการคำนวณค่า eGFR ด้วยสูตร CKD-EPI (27)

เพศ	ระดับ serum creatinine (mg/dl)	estimated glomerular filtration rate
หญิง	≤ 0.7	$GFR = 144 (SCr/0.7)^{-0.329} (0.993)^{Age}$
	> 0.7	$GFR = 144 (SCr/0.7)^{-1.209} (0.993)^{Age}$
ชาย	≤ 0.9	$GFR = 141 (SCr/0.7)^{-0.411} (0.993)^{Age}$
	> 0.9	$GFR = 141 (SCr/0.7)^{-1.209} (0.993)^{Age}$

1.4 แนวทางการรักษาผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง

การรักษาโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้ายโดยการทดแทนการทำงานของไตมี 3 วิธี ที่เป็นมาตรฐาน ดังนี้

1. การฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม (hemodialysis) คือการนำเลือดของผู้ป่วยมาผ่านตัวกรองเลือดโดยอาศัยเครื่องไตเทียมเพื่อขจัดของเสีย เกลือแร่ และสารน้ำที่คั่งอยู่ในร่างกาย (28,29) โดยปกติแล้วการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียมต้องทำที่สถานพยาบาล 2-3 ครั้งต่อสัปดาห์ ใช้เวลาครั้งละ 4-5 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังต้องมีการเตรียมต่อเส้นเลือดหรือใส่ท่อพลาสติกไว้ในหลอดเลือดดำเพื่อใช้เป็นทางสำหรับนำเลือดออกมาฟอกและใส่กลับคืนเข้าร่างกาย โดยก่อนฟอกเลือดจะต้องมีการนำเลือดจากหลอดเลือดมาฟอกโดยทำได้ 2 วิธี 1) ใช้เข็มเจาะเข้าหลอดเลือดที่หลอดเลือดบริเวณคอและหลอดเลือดขาหนีบ วิธีนี้ใช้ฟอกเลือดได้ 2-6 สัปดาห์ 2) การต่อหลอดเลือดแดง และดำ (arteriovenous [A-V] fistular) หลังต่อหลอดเลือดดำจะพองและขยายทำให้สามารถใช้เข็มเจาะเอาเลือดไปฟอกได้ วิธีนี้เป็นวิธีการถาวรแต่ต้องใช้เวลาให้หลอดเลือดดำพองตัว ขณะฟอกคนไข้สามารถอ่านหนังสือหรือรับประทานอาหารได้



ภาพที่ 4 แสดงหลักการในการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม (29)

2. การล้างไตทางช่องท้อง (continuous ambulatory peritoneal dialysis) คือการขจัดของเสียออกจากร่างกายโดยการใส่น้ำยาที่ดีเข้าไปในช่องท้องของผู้ป่วยแล้วให้ค้างไว้อยู่ในช่องท้องประมาณ 4-6 ชั่วโมง ในระหว่างที่น้ำยาดีอยู่ในช่องท้องจะมีการกรองของเสียและเกลือแร่จากเลือดผ่านเยื่อช่องท้องให้กับน้ำยา น้ำยาดีก็จะกลายเป็นน้ำยาที่มีของเสียผสมอยู่ จากนั้นก็จะทำการปล่อยน้ำยาออกจากช่องท้องเพื่อนำไปทิ้ง การล้างไตทางช่องท้องต้องทำทุกวัน วันละ 4 ครั้ง แต่สามารถทำได้เองที่บ้าน โดยจะมีผู้เชี่ยวชาญสอนวิธีการทำอย่างละเอียดและต้องมีการผ่าตัดเพื่อใส่ท่อพลาสติกไว้ที่หน้าท้องของผู้ป่วย เพื่อใช้เป็นทางใส่น้ำยาเข้าไปในช่องท้อง (30)

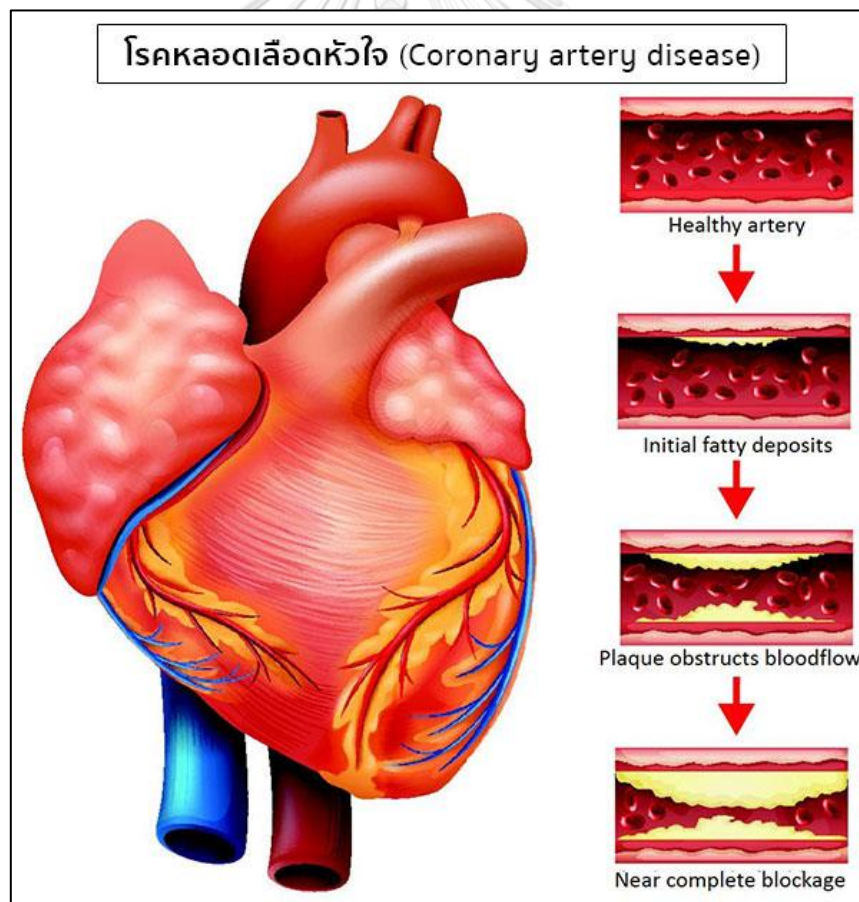
3. การปลูกถ่ายไต (kidney transplantation) คือการผ่าตัดนำไตใหม่มาปลูกถ่าย ใส่ไว้ที่บริเวณผนังหน้าท้องของผู้ป่วย โดยไตใหม่นี้อาจได้รับบริจาคจากญาติสายตรง คู่สมรสหรือจากผู้ที่เสียชีวิต และจะทำหน้าที่ทดแทนไตเก่า ปัจจุบันการปลูกถ่ายไตนั้นเป็นการรักษาบำบัดทดแทนไตที่ดีที่สุด

ตารางที่ 3 แสดงการเปรียบเทียบการบำบัดทดแทนไตวิธีต่าง ๆ (28)

วิธีการ	การฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม	การล้างไตทางช่องท้อง	การปลูกถ่ายไต
หลักการการรักษา	ขจัดของเสียในเลือดด้วยการกรองผ่านตัวกรองเลือดโดยใช้เครื่องไตเทียม	ขจัดของเสียในเลือดโดยกรองผ่านเยื่อบุช่องท้องเข้ามาอยู่ในน้ำยาที่ใส่เข้าไปในช่องท้อง	ไตที่ปลูกถ่ายสามารถทำหน้าที่ขับของเสียในเลือดได้เหมือนหรือใกล้เคียงไตปกติ
ลักษณะและสถานที่การบำบัดทดแทนไต	ต้องมีการผ่าตัดต่อเส้นเลือดหรือใส่ท่อพลาสติกในหลอดเลือดเพื่อใช้เป็นทางสำหรับนำเลือดออกมาฟอก ทำ 2-3 ครั้ง/สัปดาห์ ครั้งละ 4-5 ชม. ทำต่อเนื่องไปตลอด พยาบาลเป็นผู้ทำให้ ทำที่โรงพยาบาล/ศูนย์ไตเทียม	ต้องมีการผ่าตัดใส่ท่อพลาสติกฝังไว้ที่หน้าท้อง ทำทุกวันโดยใส่และปล่อยน้ำยา 4-5 ครั้ง/วัน ทำต่อเนื่องไปตลอด ผู้ป่วยหรือผู้ดูแลเป็นผู้ทำการล้างไตทางช่องท้องหลังจากได้รับการสอนวิธีการทำ ทำที่บ้านหรือที่ทำงาน	ต้องได้รับใบบริจาคจากญาติสายตรง คู่สมรสหรือจากผู้ป่วยที่เสียชีวิต ทำการผ่าตัดปลูกถ่ายไตที่โรงพยาบาลโดยแพทย์ มาตรวจตามแพทย์นัด ต้องรับประทานยากภูมิคุ้มกันไปตลอด
ข้อจำกัดในการรับประทานความสะอาด/อิสระ	มีการจำกัดชนิดอาหารผลไม้ และน้ำมากกว่า ไม่อิสระต้องเสียเวลามาห้องไตเทียม โดยเฉพาะถ้าผู้ป่วยอยู่ไกลและไม่มีที่ฟอกเลือดใกล้บ้าน ถ้าจะไปห้องเที่ยวหลายวันต้องติดต่อกับห้องไตเทียมที่จะเดินทางไปล่วงหน้าซึ่งค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากการฟอกเลือดทำโดยพยาบาล ผู้ป่วยที่มีความพิการทางร่างกายหรือสมองก็ทำได้ แต่อาจเกิดความไม่สะดวกแก่ญาติ ถ้าต้องรับส่งผู้ป่วยในเวลาของตัวเองทำงาน	มีการจำกัดผลไม้และน้ำน้อยกว่า ไม่ต้องเสียเวลามาห้องไตเทียม มาตรวจเฉพาะวันนัดหรือมีปัญหา ในการไปห้องเที่ยวต้องนำถุงน้ำยาไปด้วย เกิดความสะดวกแก่ญาติมากกว่าถ้าได้ดูแลผู้ป่วยที่บ้านโดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยที่มีความพิการทางร่างกายหรือสมอง	กินอาหารได้ใกล้เคียงปกติ ดำรงชีวิตได้ใกล้เคียงคนปกติ ต้องกินยาสม่ำเสมอและตรงเวลา มาตรวจตามแพทย์นัดหรือเมื่อมีอาการผิดปกติ ไปห้องเที่ยวที่ต่าง ๆ ได้ปกติ
ภาวะแทรกซ้อนจากการติดเชื้อ	ที่พบบ่อยคือการติดเชื้อในผู้ป่วยที่ใส่ท่อพลาสติกไว้ในหลอดเลือดดำซึ่งอาจทำให้เกิดภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดได้	ที่พบบ่อยคือการติดเชื้อบริเวณหน้าท้องที่ใส่ท่อพลาสติกและสามารถลุกลามจนเกิดการติดเชื้อในช่องท้องได้	ต้องระมัดระวังอย่างมาก โดยเฉพาะในระยะแรก ๆ ที่ผู้ป่วยได้รับยากภูมิคุ้มกันขนาดสูงซึ่งอาจติดเชื้อรุนแรงถึงชีวิตได้
อัตราการรอดชีวิต	โดยรวมแล้วใกล้เคียงกับการล้างไตทางช่องท้อง	โดยรวมแล้วใกล้เคียงกับการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม	ดีกว่ามากโดยเฉพาะหลังจากปลูกถ่ายไตไปแล้ว 3 เดือน
การเตรียมความพร้อมอื่น ๆ	ต้องมีการผ่าตัดต่อเส้นเลือดล่วงหน้าอย่างน้อย 4 เดือน	ต้องมีการผ่าตัดใส่ท่อพลาสติกฝังไว้ที่หน้าท้องล่วงหน้าอย่างน้อย 2 สัปดาห์	ควรหลีกเลี่ยงการได้รับเลือด

2. ภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว

ปัจจุบันโรคหลอดเลือดแดงแข็งตัวหรือตีบตัน เป็นสาเหตุของอัตราการป่วยและอัตราการตายอันดับต้น ๆ ของประชากรทั่วโลก (31) โดยเฉพาะหลอดเลือดที่หัวใจและสมอง ภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัวเป็นภาวะหลอดเลือดแดงที่เกิดการอักเสบจากการสะสมของไขมันและเซลล์ชนิดต่าง ๆ ที่ผนังหลอดเลือด ทำให้ผนังหลอดเลือดหนาตัวขึ้นจนรัศมีของหลอดเลือดลดลงจึงจำกัดการไหลเวียนเลือดไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ ก่อให้เกิดภาวะเนื้อเยื่อตายจากการขาดเลือด (32) เช่น ถ้าเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งที่หัวใจอาจส่งผลให้เกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจตาย (myocardial infarction) หรือถ้าเกิดขึ้นที่สมองอาจก่อให้เกิดโรคหลอดเลือดสมองตีบ (stroke) สำหรับสาเหตุที่ก่อให้เกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งมีหลายปัจจัยด้วยกันรวมทั้ง โรคเบาหวาน โรคความดันโลหิตสูง ภาวะไขมันในเลือดสูง สูบบุหรี่ เครียด น้ำหนักเกิน ขาดการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ หรือมีประวัติสมาชิกในครอบครัวเป็นโรคของหลอดเลือด (33)



ภาพที่ 5 แสดงการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งที่บริเวณหัวใจหรือโรคหลอดเลือดหัวใจ (32)

2.1 อาการของโรคหลอดเลือดแดงแข็ง

ในระยะแรกผู้ป่วยมักไม่พบอาการใด ๆ แต่เมื่อไขมันก่อตัวขึ้นจนหลอดเลือดแดงแข็งและไม่สามารถส่งเลือดไปเลี้ยงเนื้อเยื่อและอวัยวะต่าง ๆ ได้ จะทำให้เกิดอาการต่าง ๆ ซึ่งแตกต่างกันออกไปตามบริเวณที่มีหลอดเลือดแดงแข็ง (33) ดังต่อไปนี้

1. หลอดเลือดแดงแข็งที่แขนและขา เลือดไปเลี้ยงแขน ขา และกระดูกเชิงกรานไม่เพียงพอ จึงทำให้เกิดอาการปวดและชาบริเวณแขนและขา อาจทำให้เป็นตะคริวบ่อยครั้ง มือและเท้าเย็น หากหลอดเลือดตีบมากอาจทำให้มือและเท้ามีสีเขียวคล้ำและอาจเกิดการติดเชื้ออย่างรุนแรงได้

2. หลอดเลือดแดงแข็งที่ไต อาจทำให้เนื้อเยื่อไตขาดเลือดและส่งผลกระทบต่อการทำงานของไต ทำให้เหนื่อยง่าย เบื่ออาหาร คลื่นไส้ เท้าบวม ปัสสาวะผิดปกติ ซึ่งน้ำปัสสาวะอาจมากหรือน้อยผิดปกติ ร่วมกับมีความดันโลหิตสูง

3. หลอดเลือดแดงแข็งที่หัวใจ เมื่อกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดจะส่งผลให้เกิดอาการเจ็บหน้าอก เหมือนมีอะไรมาค้ำทับโดยอาการเจ็บหน้าอกจะรุนแรงขึ้นเมื่อทำกิจกรรมต่าง ๆ และจะทุเลาลงเมื่อหยุดพัก นอกจากนี้ผู้ป่วยมักมีอาการเจ็บร้าวมาที่คอ กระดูกกราม ไหล่ และแขนโดยเฉพาะฝั่งซ้ายของร่างกาย มีเหงื่อออกมาก หายใจหอบเหนื่อย หัวใจเต้นผิดปกติ คล้ายจะเป็นลมหรือหมดสติได้

4. หลอดเลือดแดงแข็งที่คอและสมอง หลอดเลือดแดงบริเวณลำคอมีหน้าที่ส่งเลือดไปเลี้ยงสมองหากเกิดหลอดเลือดแดงแข็งที่คอจะทำให้เลือดไปเลี้ยงสมองไม่เพียงพอด้วยเช่นกัน ส่งผลให้มีอาการแขนขาอ่อนแรงเฉียบพลัน ปวดศีรษะอย่างมากในทันที วิงเวียน สับสน ปากเบี้ยว พูดไม่ชัด หรือพูดไม่ได้ ตามองไม่เห็นชั่วคราว 1 ชั่วโมง ซึ่งเป็นอาการของโรคเส้นเลือดสมองตีบชั่วคราว หากไม่ได้รับการรักษาอาจทำให้เกิดโรคหลอดเลือดสมองได้ นอกจากนี้ ผู้ป่วยอาจรู้สึกขาบริเวณใบหน้า แขน และขา สูญเสียการทรงตัว เป็นอัมพาตและหายใจไม่ได้

หากพบอาการที่บ่งบอกว่าเลือดไหลเวียนได้ไม่ดี เช่น เจ็บหน้าอก รู้สึกปวดหรือมีอาการขาที่ขา รวมถึงอาการอื่น ๆ ข้างต้น หรือสงสัยในอาการป่วยของตนเอง ควรรีบไปพบแพทย์ เพราะหากวินิจฉัยและรักษาโรคได้เร็วก็อาจช่วยลดความรุนแรงของโรค ป้องกันภาวะหัวใจขาดเลือด โรคหลอดเลือดสมองและภาวะเจ็บป่วยอื่น ๆ ได้

2.2 สาเหตุของโรคหลอดเลือดแดงแข็ง

ในปัจจุบันยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัดของโรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) แต่โรคนี้ อาจเกิดขึ้นเมื่อผนังด้านในของหลอดเลือดได้รับความเสียหายจนทำให้เซลล์เม็ดเลือดหรือสารอื่น ๆ เช่น ไขมัน หรือแคลเซียม ก่อตัวขึ้นและทำให้หลอดเลือดแดงตีบ แข็ง หรืออุดตัน ทำให้เลือดและออกซิเจนไปเลี้ยงเนื้อเยื่อรวมถึงอวัยวะบริเวณใกล้เคียงไม่เพียงพอ และส่งผลกระทบต่อการทำงานของอวัยวะนั้น ๆ โดยมีปัจจัยเสี่ยงหลายอย่างที่ทำให้เกิดโรค atherosclerosis (33,34) ได้แก่

1. อายุ ผู้ที่มีอายุมากจะเสี่ยงเกิดโรคนี้ได้มากกว่า โดยเฉพาะเพศชายอายุตั้งแต่ 45 ปี ขึ้นไป และเพศหญิงอายุตั้งแต่ 55 ปี ขึ้นไป
2. พันธุกรรม มีพ่อ พี่ชาย หรือน้องชายเป็นโรคหัวใจก่อนอายุ 55 ปี หรือมีแม่ พี่สาว หรือน้องสาวเป็นโรคหัวใจก่อนอายุ 65 ปี
3. ไขมันในเลือดสูง โดยเฉพาะมีไขมันชนิดที่ไม่ดีในปริมาณมากและมีไขมันชนิดที่ดีในปริมาณน้อย รวมถึงผู้ที่อ้วนหรือมีน้ำหนักตัวเกิน
4. ความดันโลหิตสูง ตั้งแต่ 140/90 มิลลิเมตรปรอท ขึ้นไปและหากเป็นโรคเบาหวานหรือโรคไตเรื้อรังร่วมด้วยจะมีความเสี่ยงเป็นโรคนี้หากมีค่าความดันโลหิตสูงตั้งแต่ 130/80 มิลลิเมตรปรอทขึ้นไป
5. โรคเบาหวาน เมื่อร่างกายไม่สามารถนำน้ำตาลไปใช้ได้อย่างเต็มที่จะส่งผลให้ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น และเป็นสาเหตุทำให้ผนังหลอดเลือดอักเสบได้
6. ภาวะดื้ออินซูลิน เนื่องจากอินซูลินเป็นฮอร์โมนที่ช่วยนำน้ำตาลเข้าสู่เซลล์เพื่อใช้เป็นพลังงาน หากเกิดภาวะดื้ออินซูลินอาจทำให้เกิดโรคเบาหวานซึ่งเสี่ยงเกิดหลอดเลือดอักเสบตามมาได้
7. ภาวะหยุดหายใจขณะหลับ หากไม่ได้รับการรักษาที่ถูกต้องจะทำให้เสี่ยงเกิดปัญหาสุขภาพอื่น ๆ ที่เป็นปัจจัยเสี่ยงของโรคนี้ เช่น ความดันโลหิตสูง โรคเบาหวาน ภาวะหัวใจขาดเลือด และโรคหลอดเลือดสมอง เป็นต้น
8. ระดับโปรตีน C-reactive protein (CRP) ในเลือดสูง บ่งบอกถึงการอักเสบที่เกิดขึ้นในร่างกาย ซึ่งเป็นความเสี่ยงของการเกิดภาวะหัวใจขาดเลือดและโรค atherosclerosis
9. ระดับไขมันไตรกลีเซอไรด์ในเลือดสูง โดยเฉพาะในเพศหญิงจะยิ่งเสี่ยงต่อการเกิดโรคนี้ได้
10. ขาดการออกกำลังกาย อาจส่งผลให้มีไขมันคอเลสเตอรอลสูง ความดันโลหิตสูง เป็นโรคเบาหวาน โรคอ้วน หรือมีน้ำหนักตัวเกิน ซึ่งเป็นปัจจัยเสี่ยงของโรคนี้
11. อารมณ์และความเครียด เป็นปัจจัยที่ทำให้เกิด atherosclerosis และภาวะหัวใจขาดเลือดได้
12. การสูบบุหรี่ อาจสร้างความเสียหายต่อหลอดเลือดเพราะมีสารพิษที่ทำให้ผนังหลอดเลือดอักเสบ รวมถึงส่งผลให้ระดับคอเลสเตอรอลในเลือดและความดันโลหิตสูงขึ้น และขัดขวางการลำเลียงออกซิเจนจนทำให้ไปเลี้ยงเนื้อเยื่อของร่างกายไม่เพียงพอ
13. การรับประทานอาหารที่ไม่มีประโยชน์ เช่น รับประทานอาหารที่มีไขมันทรานส์ ไขมันอิ่มตัว คอเลสเตอรอล โซเดียม และน้ำตาลในปริมาณสูง
14. การดื่มแอลกอฮอล์ปริมาณมาก อาจสร้างความเสียหายให้กับกล้ามเนื้อหัวใจ และกระตุ้นให้เกิดปัจจัยเสี่ยงอื่น ๆ จนทำให้เกิดโรคนี้ขึ้นได้

2.3 การวินิจฉัยโรคหลอดเลือดแดงแข็ง

แพทย์วินิจฉัย atherosclerosis จากประวัติอาการป่วยและปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ ของผู้ป่วย ร่วมกับการตรวจร่างกาย และตรวจหาอาการหรือสัญญาณที่บ่งบอกว่าหลอดเลือดแข็งหรือตีบตัน เช่น ซีพจรบริเวณหลอดเลือดที่มีปัญหาเด่นอ่อนกว่าปกติ ความดันโลหิตที่แขนและขาลดต่ำลง หรือใช้หูฟังของแพทย์ตรวจแล้วได้ยินเสียงฟู่ภายในหลอดเลือดแดง โดยแพทย์อาจวินิจฉัยด้วยวิธีการอื่น ๆ เพิ่มเติม (32) ดังนี้

1. การตรวจเลือดเพื่อตรวจระดับไขมันชนิดต่าง ๆ หรือระดับน้ำตาลในเลือดที่เป็นปัจจัยเสี่ยงให้เกิดโรคนี้นี้
2. การเอกซเรย์และการสแกน เช่น การเอกซเรย์ปอด การอัลตราซาวด์ การเอกซเรย์คอมพิวเตอร์หรือการสแกนคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าเพื่อแสดงภาพของหลอดเลือดที่มีปัญหา เป็นต้น
3. การตรวจโดยใช้คลื่นอัลตราซาวด์ เป็นการวัดระดับความดันโลหิตที่บริเวณต่าง ๆ ของแขนและขา ซึ่งจะแสดงตำแหน่งของการอุดตันและความเร็วของเลือดที่ไหลเวียนอยู่ในหลอดเลือดแดง
4. การตรวจคลื่นไฟฟ้าหัวใจ เพื่อวินิจฉัยภาวะหัวใจขาดเลือด และตำแหน่งที่มีภาวะหัวใจขาดเลือด
5. การตรวจคลื่นหัวใจขณะออกกำลังกาย เป็นการเก็บข้อมูลการทำงานของหัวใจในระหว่างการออกกำลังกาย เพราะหัวใจสูบฉีดเร็วกว่าการทำกิจกรรมในชีวิตประจำวัน ซึ่งจะแสดงให้เห็นถึงการทำงานของหัวใจที่ผิดปกติ
6. การสวนหลอดเลือดหัวใจโดยการฉีดสี เป็นการตรวจหลอดเลือดด้วยการฉีดสารทึบแสงแล้วเอกซเรย์เพื่อให้เห็นหลอดเลือดหัวใจที่ตีบตันได้อย่างชัดเจน

2.4 การรักษาโรคหลอดเลือดแดงแข็ง

การรักษาโรคนี้นี้มีจุดประสงค์เพื่อบรรเทาอาการของโรค ลดความเสี่ยงของการเกิดลิ้มเลือดลดปัจจัยที่ก่อให้เกิดไขมันในหลอดเลือดแดง ขยายหลอดเลือดแดงที่ได้รับผลกระทบจากไขมัน และป้องกันโรคที่อาจเกิดขึ้นจาก atherosclerosis ซึ่งสามารถทำได้ (32-34) ดังนี้

2.4.1 การใช้ยา

1. ยาลดไขมัน เช่น ยาในกลุ่มสแตติน ซึ่งจะช่วยลดการก่อตัวของไขมันชนิดที่ไม่ดีในหลอดเลือดแดง และช่วยกระตุ้นให้คอเลสเตอรอลชนิดที่ดีให้ทำงานได้ดีขึ้น
2. ยาต้านเกล็ดเลือด เช่น ยาแอสไพริน เพื่อลดการก่อตัวของเกล็ดเลือดในหลอดเลือดแดงที่อาจเป็นสาเหตุของหลอดเลือดอุดตันในอนาคต
3. ยาละลายลิ้มเลือด ในกรณีที่ลิ้มเลือดเป็นสาเหตุทำให้เกิดการตีบตันของหลอดเลือดแดง

4. ยาเบต้าบล็อกเกอร์ เช่น ยาอะซิบูโทลอล ยาอะทีโนลอล หรือยาโพรพราโนลอล ซึ่งเป็นยาที่ใช้รักษาโรคหลอดเลือดหัวใจ เพื่อลดอัตราการเต้นของหัวใจ ลดความดันโลหิต บรรเทาอาการเจ็บหน้าอก ลดความเสี่ยงของภาวะหัวใจขาดเลือดและหัวใจเต้นผิดจังหวะบางประเภท

5. ยาเอซีอีอินฮิบิเตอร์ เช่น ยาเบนนาซีพริล ยาแคปโตพริล หรือยาอีนาลาพริล ซึ่งจะช่วยลดความดันโลหิต เป็นประโยชน์ต่อหลอดเลือดหัวใจ และลดความเสี่ยงของภาวะหัวใจขาดเลือด

6. ยาแคลเซียมแชนแนลบล็อกเกอร์ เช่น ยาแอมโลดิปีน ยาดีลไทอะเซม หรือยาฟีโลดิปีน เพื่อป้องกันแคลเซียมเข้าสู่เซลล์หัวใจและผนังหลอดเลือด ช่วยให้ความดันโลหิตลดลง และอาจใช้บรรเทาอาการเจ็บหน้าอกได้ด้วยเช่นกัน

7. ยาขับปัสสาวะ เช่น ยาคลอโรไทอะไซด์ ยาบูมีทาไมด์ หรือยาอะมิโลไรด์ เพื่อกำจัดโซเดียมและของเหลวส่วนเกินออกจากร่างกาย ซึ่งส่งผลให้ความดันของผนังหลอดเลือดลดลง

2.4.2 การผ่าตัด

มักใช้ในกรณีที่ผู้ป่วยมีอาการรุนแรงหรือเกิดการอุดตันของหลอดเลือดที่อาจเป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อและกล้ามเนื้อ ซึ่งการผ่าตัดสามารถทำได้หลายวิธี ดังนี้

1. การผ่าตัดขยายหลอดเลือด โดยใช้ท่อ บอลลูน หรือลวดตาข่าย เพื่อขยายหลอดเลือดที่เกิดการตีบตัน ทำให้เลือดไหลเวียนได้ตามปกติ และบรรเทาอาการเจ็บหน้าอกจากภาวะหัวใจขาดเลือด

2. การทำบายพาส เป็นการผ่าตัดเพื่อทำทางเบี่ยงหลอดเลือดที่แข็งหรือเกิดการอุดตัน เพื่อให้เลือดไหลเวียนเข้าสู่หัวใจได้ตามปกติ บรรเทาอาการเจ็บหน้าอก และป้องกันภาวะหัวใจขาดเลือด

3. การผ่าตัดเปิดหลอดเลือด เพื่อกำจัดตะกรันไขมันที่เกาะตามผนังหลอดเลือดที่คอ ทำให้เลือดไหลเวียนไปที่สมองได้ตามปกติ และช่วยป้องกันการเกิดโรคหลอดเลือดสมองด้วย

2.4.3 การดูแลตนเอง

แพทย์อาจแนะนำให้ผู้ป่วยดูแลตนเองมากขึ้นด้วยการปรับเปลี่ยนพฤติกรรม เช่น เลิกสูบบุหรี่ รับประทานอาหารที่มีประโยชน์ ออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ ควบคุมน้ำหนัก หลีกเลี่ยงพฤติกรรมที่ทำให้น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้นหรือก่อให้เกิดโรคอ้วนได้ เป็นต้น

2.5 ภาวะแทรกซ้อนของโรคหลอดเลือดแดงแข็ง

ภาวะแทรกซ้อนจะแตกต่างกันออกไปตามอวัยวะที่มีหลอดเลือดแดงแข็ง (33,34) ดังต่อไปนี้

1. หลอดเลือดแดงแข็งที่แขนและขา เมื่อเลือดไปเลี้ยงแขนและขาไม่เพียงพอ อาจทำให้เกิดโรคหลอดเลือดแดงส่วนปลายตีบ ซึ่งจะมีอาการปวดขาและในบางกรณีอาจทำให้เนื้อเยื่อเน่าตายได้

2. หลอดเลือดแดงแข็งที่ไต หากเลือดและออกซิเจนไปเลี้ยงไตไม่เพียงพออาจทำให้ไตทำงานได้น้อยลง ทำให้เกิดโรคไตเรื้อรังและไตวายตามมาได้

3. หลอดเลือดแดงแข็งที่คอและสมอง เมื่อเลือดไปเลี้ยงสมองไม่เพียงพออาจทำให้เกิดโรคหลอดเลือดแดงคาโรติดตีบตัน ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้สมองขาดเลือดชั่วคราวหรือเกิดโรคหลอดเลือดสมองจนทำให้เป็นอัมพาตและอาจเสียชีวิตได้

4. หลอดเลือดแดงแข็งที่หัวใจ ทำให้เกิดโรคหลอดเลือดหัวใจ ส่งผลให้เกิดอาการเจ็บหน้าอก และเสี่ยงต่อภาวะหัวใจขาดเลือดหรือหัวใจล้มเหลวจนอาจเสียชีวิตได้

นอกจากนี้โรค atherosclerosis ยังอาจส่งผลให้เกิดโรคหลอดเลือดโป่งพองที่สามารถเกิดขึ้นได้ทั่วร่างกาย ทั้งบริเวณสมอง หลอดเลือดใหญ่ ขา หรือม้าม ซึ่งถือว่าเป็นภาวะแทรกซ้อนรุนแรงและอาจเป็นอันตรายถึงชีวิต

2.6 การป้องกันโรคหลอดเลือดแดงแข็ง

การปรับเปลี่ยนวิถีชีวิตประจำวันอาจช่วยป้องกันและชะลอการเกิดโรค atherosclerosis ได้ โดยอาจปฏิบัติตามวิธีการ (34) ดังต่อไปนี้

1. เลิกบุหรี่ เพราะบุหรี่จะทำให้หลอดเลือดแดงเกิดความเสียหาย และการเลิกสูบบุหรี่ยังช่วยลดการเกิดภาวะแทรกซ้อนของโรคนี้ได้ด้วยเช่นกัน

2. ควบคุมปริมาณการดื่มแอลกอฮอล์ โดยผู้ชายไม่ควรดื่มเกินวันละ 2 ดื่มมาตรฐาน และผู้หญิงไม่ควรดื่มเกินวันละ 1 ดื่มมาตรฐาน

3. ออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้กล้ามเนื้อได้ใช้ออกซิเจนอย่างเต็มประสิทธิภาพ อีกทั้งยังช่วยกระตุ้นการไหลเวียนของเลือด ช่วยสร้างหลอดเลือดใหม่ ลดความดันโลหิต และลดความเสี่ยงของโรคเบาหวานได้

4. รับประทานอาหารที่มีประโยชน์ ได้แก่ ผัก ผลไม้ ธัญพืช และหลีกเลี่ยงอาหารที่มีไขมันทรานส์ ไขมันอิ่มตัว คอเลสเตอรอล โซเดียม และน้ำตาลสูง

5. ควบคุมน้ำหนัก โดยเฉพาะผู้ที่มีน้ำหนักตัวเกิน เพื่อช่วยลดความเสี่ยงของความดันโลหิตสูง คอเลสเตอรอลสูง และโรคเบาหวาน ซึ่งลดความเสี่ยงของการเกิดโรคนี้ได้

6. ทำกิจกรรมผ่อนคลายความเครียด เช่น ทำงานอดิเรกที่สนใจ หรือนั่งสมาธิ เพื่อบรรเทาความเครียดซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดโรค atherosclerosis

3. การตรวจประเมินหลอดเลือดแดงด้วยวิธี cardio-ankle vascular index

ปัจจุบันมีวิธีการตรวจประเมินหลอดเลือดแดงส่วนปลายโดยการใช้เครื่องมือมาตรฐานเป็นการตรวจแบบไม่รุกรานเข้าไปในร่างกาย ซึ่งสามารถประเมินภาวะหลอดเลือดแดงแข็งได้โดยดูจากค่าดัชนีวัดความแข็งของหลอดเลือดแดงหัวใจถึงข้อเท้า (cardio-ankle vascular index; CAVI) (35) ซึ่งค่า

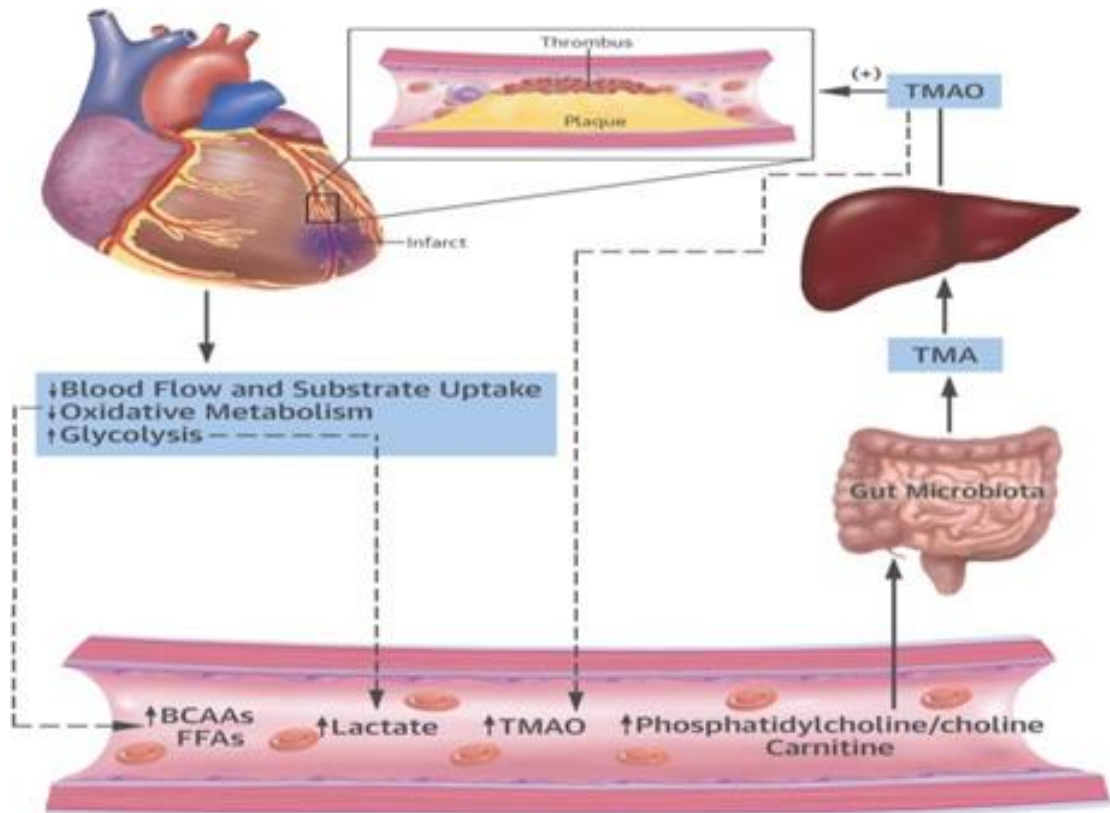
CAVI นี้ได้ถูกนำมาใช้เป็นตัวคัดกรองภาวะหลอดเลือดแดงแข็งหรือหลอดเลือดแดงเสียความยืดหยุ่นจากการเสื่อมสภาพซึ่งจะนำไปสู่การเป็นโรคหลอดเลือดแดงตีบ เช่น หลอดเลือดหัวใจตีบ ไตวายเรื้อรัง เป็นต้น โดยผลการตรวจถ้าค่า CAVI < 8 แสดงว่าหลอดเลือดแดงปกติ ค่า CAVI ระหว่าง 8-9 แสดงว่าผู้ป่วยมีภาวะเสี่ยงต่อการเกิดหลอดเลือดแดงแข็ง ถ้าค่า CAVI ≥ 9 แสดงว่ามีภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (36) ในอดีตแพทย์ได้ใช้การวัดความเร็วของคลื่นพัลส์ (pulse wave velocity) ในการวัดความแข็งของหลอดเลือดเพื่อทำนายการเจ็บป่วยและการตายในประชากรที่แตกต่างกัน แม้ว่าการวัดความเร็วของคลื่นพัลส์นี้ถือเป็นวิธีมาตรฐาน (gold standard) สำหรับการประเมินความแข็งของหลอดเลือด แต่ก็มีข้อจำกัดหลายประการ ได้แก่ ความไวต่อระดับความดันโลหิต ความซับซ้อนของขั้นตอนการวัด ความลำเอียงของการกำหนดระยะทาง เป็นต้น นักวิจัยชาวญี่ปุ่นได้พัฒนา CAM ขึ้นมา (35) โดยใช้อุปกรณ์ที่มีชื่อเรียกว่า VaSera เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจวัดดัชนีความแข็งตึงของหลอดเลือดจากต้นกำเนิดของหลอดเลือดแดงใหญ่ไปจนถึงข้อเท้า ในทางทฤษฎีพารามิเตอร์และอุปกรณ์ใหม่นี้ มีข้อได้เปรียบบางอย่าง เช่น ความเป็นอิสระจากระดับความดันโลหิตในเวลาที่ทำ การวัด ความสามารถในการทำซ้ำและความไวสูง และอุปกรณ์ที่ใช้งานง่ายด้วยขั้นตอนที่ง่ายขึ้น และที่ผ่านมามีนักวิจัยคณะต่าง ๆ นำหลักการของ CAVI นี้ไปใช้ในการศึกษาทางงานวิจัยต่าง ๆ มากมาย

4. Trimethylamine N-oxide (TMAO)

TMAO เป็นสารโปรตีนที่พบมากในสัตว์ทะเลโดยเฉพาะในปลาทะเลน้ำลึก นักวิทยาศาสตร์ทางทะเลเข้าใจว่าเป็นโปรตีนที่ทำให้ร่างกายสมดุลจากการที่อยู่ในทะเลแล้วต้องมีการสร้างโปรตีนยูเรียขึ้นมา จึงต้องมีโปรตีนนี้คอยสมดุลกัน การศึกษาและวิจัย TMAO นั้นมีมานานแต่ส่วนมากทำในสัตว์ และพบว่าเอนไซม์ TMAO reductase ที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียจะย่อยสลาย TMAO ไปเป็น trimethylamine (TMA) ในสัตว์ทะเลคือเหตุสำคัญที่ทำให้สัตว์ทะเลมีกลิ่นของอาหารทะเล คือกลิ่นจาก TMA นั้นเอง (37)

ปกติแล้วร่างกายคนเรามี TMA และ TMAO โดยเริ่มจากแบคทีเรียในทางเดินอาหารจะย่อยสลาย phosphatidylcholine และคาร์นิทีนในอาหารไปเป็น TMA หลังจากนั้นเอนไซม์ flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) จากตับจะเปลี่ยน TMA ไปเป็น TMAO ซึ่ง phosphatidylcholine หรือ lecithin และคาร์นิทีนนี้จะพบในเนื้อสัตว์ที่เป็นเนื้อแดง ถั่วเหลือง อาหารเสริม เครื่องดื่มให้พลังงาน ไข่แดง (38) และยังพบอีกว่าปริมาณเส้นใยในผักผลไม้ จะช่วยลด TMAO ลงได้ แสดงให้เห็นว่า TMAO ในร่างกายมาจากหลายขั้นตอน อาจเกิดจากอาหารที่รับประทานเข้าไปมาก หรือ เหลือ phosphatidylcholine ไปถึงลำไส้มาก หรือ มีแบคทีเรีย โดยเฉพาะกลุ่ม *Clostridias* และ *Ruminococcus* (8,9) หรือร่างกายสังเคราะห์ TMAO ผิดพลาดจากระบบเอนไซม์ (39) ในช่วง 5 ปีที่ผ่านมา มีงานวิจัยออกมาจำนวนมาก ที่ค้นพบความสัมพันธ์ของ

ระดับ TMAO ที่สูงขึ้นเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือด (40) โดยพบ TMAO ที่สูงขึ้นในผู้ป่วยโรคหัวใจวาย แสดงให้เห็นว่ากลุ่มคนที่มีอาการของโรคดังกล่าวจะพบระดับ TMAO ที่สูงกว่าคนปกติทั่วไปอย่างชัดเจน โดยการพบว่าระดับ TMAO ที่สูงขึ้นจะสัมพันธ์กับการเกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัว ซึ่งมีผลมาจากการกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวเคลื่อนที่เข้ามาจับกินไขมันโดยเฉพาะผู้ที่มีไขมันในเลือดสูง และทำให้เกิดการอักเสบตามมาก่อให้เกิดเส้นเลือดตีบตันได้ โดยในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจเรื้อรังที่พบ TMAO ในเลือดสูงจะมีอัตราการเสียชีวิตสูงกว่ากลุ่มที่ TMAO ปกติถึง 4 เท่า (38-40) งานวิจัยต่าง ๆ เหล่านี้บอกได้ถึงความสัมพันธ์ของโรคหลอดเลือดกับระดับ TMAO ในเลือด แต่ยังไม่ได้บอกความเป็นเหตุเป็นผลที่ชัดเจน ซึ่งจำเป็นต้องมีการศึกษาข้อมูลเชิงลึกเพิ่มเติมต่อไป และมีงานวิจัยที่ค้นพบ TMAO ในเลือดสูง ที่เกี่ยวข้องกับอัตราการเสียชีวิตมากขึ้นในโรคปอดอักเสบติดเชื้อ (41) โดยไม่มีความสัมพันธ์กับโรคหัวใจ หรือ phosphatidylcholine, lecithin ในอาหารที่ต่างชนิดกันไม่ได้ส่งผลต่อหัวใจและหลอดเลือดเหมือนกันทั้งหมด ทำให้ไม่สามารถสรุปได้ว่า ระดับของ TMAO ในเลือดอย่างเดียวมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลอดเลือดอย่างชัดเจน ต้องรอการศึกษาเพิ่มเติมว่ามีปัจจัยอะไรบ้างที่เชื่อมโยงความสัมพันธ์กัน และถ้าทำการลดระดับของ TMAO ในเลือดลงจะพบอุบัติการณ์ของโรคหลอดเลือดและหัวใจลดลงหรือไม่ รวมถึงต้องทำการพิสูจน์ปัจจัยต่าง ๆ ด้วย เช่น การลดไขมันอิ่มตัว การลดไขมันทรานส์ การรับประทานอาหารทะเลในปริมาณที่ไม่มากเกินไป การงดบุหรี่ งดดื่มสุรา ลดน้ำหนักให้กลับมาอยู่ในเกณฑ์พอดี ออกกำลังกายสม่ำเสมอ โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังระยะสุดท้ายที่ไม่สามารถขับสาร TMAO ออกได้เหมือนคนทั่วไป



ภาพที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ของ TMAO ในการเกิดโรคหัวใจขาดเลือดหรือกล้ามเนื้อหัวใจตาย (38)

5. โฟมเซลล์ (foam cells) และ TMAO

การก่อตัวของโฟมเซลล์จากเซลล์แมคโครเฟจเกิดขึ้นจากปัจจัยหลายประการรวมถึงการควบคุมปริมาณไลโปโปรตีนความหนาแน่นต่ำ (LDL) ที่ไม่สามารถควบคุมได้ (42) การควบคุมระดับเอสเทอร์ฟิเคชันของคอเลสเตอรอลและความผิดปกติของกลไกที่เกี่ยวข้องกับการปลดปล่อยคอเลสเตอรอล (43-45) โดยกระบวนการนี้เกี่ยวข้องกับ LDL ที่มีมากเกินไป แต่การเกิดโรคนี้ไม่ได้เกิดขึ้นเนื่องจากการจับตัวกันของ LDL เท่านั้น ในขั้นตอนที่ 1 LDL ที่มีมากเกินไปจะเข้าไปอยู่ภายในเนื้อเยื่อของหลอดเลือดแดง และจะถูกดัดแปลงต่อไป โมเลกุลของ LDL ที่ถูกดัดแปลงนี้จะกระตุ้นการผลิตโมเลกุลที่ทำหน้าที่ยึดเกาะ (adhesion molecules) ดังแสดงในภาพที่ 7 เป็นส่วนที่ยื่นออกมาเข้าสู่กระแสเลือด โมเลกุลที่ทำหน้าที่ยึดเกาะเหล่านี้ จะดึงดูดโมโนไซต์ (monocyte) และทีเซลล์ (T-cells) นอกจากนี้เซลล์เอนโดทีเลียล (endothelial) ที่ผนังหลอดเลือดแดงก็ยังปล่อยคีโมไคน์ (chemokine) ออกมาเพื่อดึงดูดโมโนไซต์เข้ามาในหลอดเลือดแดง บริเวณนั้น ๆ ในขั้นตอนที่ 2 โมโนไซต์จะเจริญไปเป็นเซลล์แมคโครเฟจที่พร้อมทำงานและผลิตโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (Inflammatory molecule) หลายชนิด เซลล์แมคโครเฟจเหล่านี้ยังทำหน้าที่กำจัด LDL ที่ถูกดัดแปลงด้วย ในขั้นตอนที่ 3 เซลล์แมคโครเฟจจะคงย่อย LDL อย่างต่อเนื่องทำให้ภายในเซลล์เต็มไปด้วย

ด้วยก้อนไขมัน ทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่าโฟมเซลล์ ซึ่งจะเป็นสัญญาณแรกเริ่มของโรคหลอดเลือดแดงแข็ง ในขั้นตอนที่ 4 การอักเสบจะส่งเสริมการเติบโตของพลาแก (plaque) และการก่อตัวของไฟบรัสแคป (fibrous cap) ครอบไขมันไว้ ซึ่งไฟบรัสแคปนี้จะยื่นเข้าไปในกระแสเลือด แต่ก็ช่วยป้องกันการเกาะตัวของเลือด และในขั้นตอนสุดท้ายโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจำนวนมากจะทำให้เกิดการแตกออกของไฟบรัสแคป และโฟมเซลล์จะปล่อยแฟกเตอร์ของเนื้อเยื่อ (tissue factor) ซึ่งเป็นสารที่ทำให้เลือดแข็งตัวออกมาด้วย plaque จะแตกออกซึ่งทำให้เกิดการสร้าง thrombus (thrombus) หรือการแข็งตัวของเลือดในหลอดเลือดแดง ซึ่งถ้าเลือดที่แข็งตัวนี้มีขนาดใหญ่พอ จะเป็นสาเหตุทำให้หัวใจวายหรือการตายของเซลล์หัวใจ

โดยสรุปการตีบหรืออุดตันของหลอดเลือดกับบทบาทของแมคโครเฟจ (42) ดังนี้

1. ภาวะที่มีการเพิ่มของคอเลสเตอรอล โดยเฉพาะคอเลสเตอรอลในอนุภาคเชิงซ้อนของไขมันและโปรตีนที่เรียกว่า ลิโปโปรตีนชนิดความหนาแน่นต่ำ ที่รู้จักดีในชื่อ LDL หรือบางคนเรียกว่าไขมันชนิดเลว ทำให้เกิดการสะสมของกลุ่มไขมัน แคลเซียม และเซลล์ต่าง ๆ ที่ผนังของหลอดเลือด ส่งผลให้โครงสร้างของผนังด้านในของหลอดเลือดบาดเจ็บ

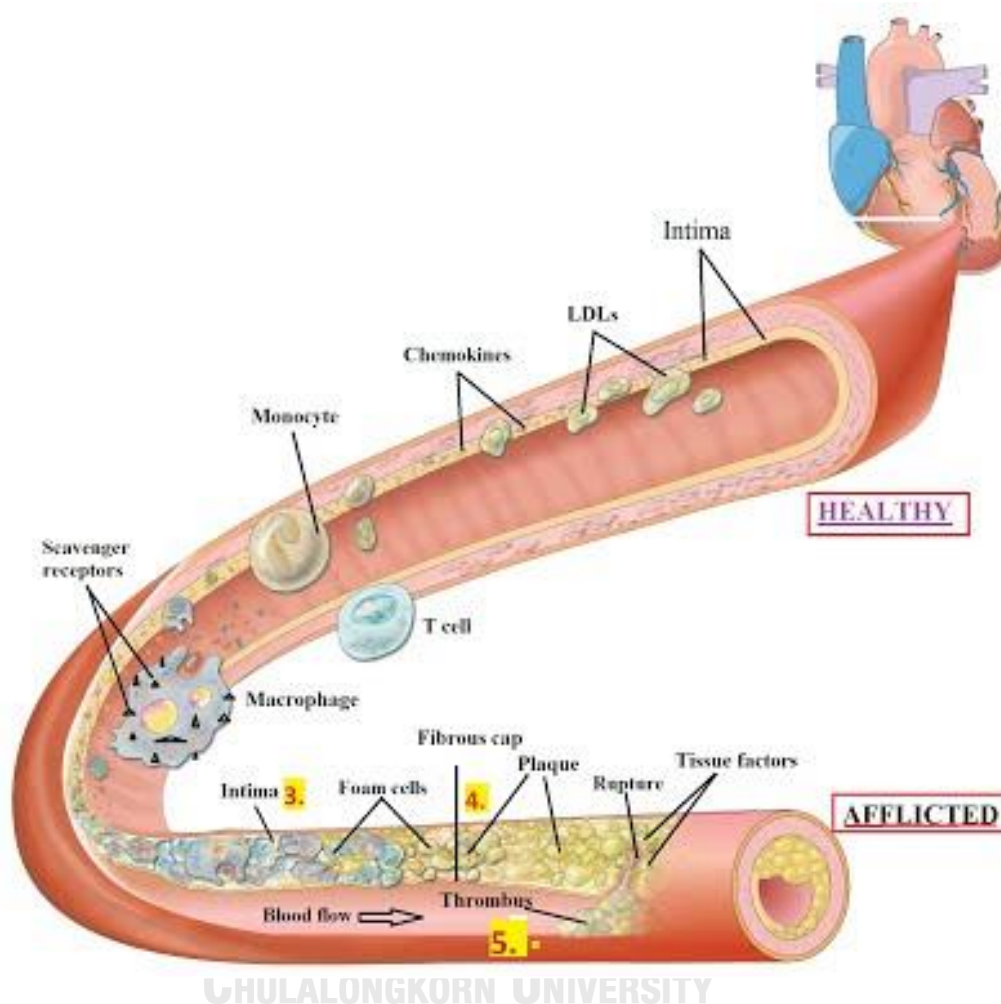
2. ในสภาวะที่ร่างกายมีสารอนุมูลอิสระ (free radical) หรืออนุพันธ์ของออกซิเจนที่ว่องไว (reactive oxygen species; ROS) เพิ่มมากขึ้น แต่มีสารต้านลดลง อนุพันธ์เหล่านี้จะออกซิไดส์ LDL ทำให้โมเลกุลเปลี่ยนแปลงไปกลายเป็น oxidized LDL ซึ่งจะยิ่งเข้ามาสะสมที่ผนังด้านในของหลอดเลือดที่บาดเจ็บได้ดีขึ้น

3. การสะสมของ oxidized LDL จะกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครเฟจพัฒนาและเคลื่อนที่เข้ามาจับกิน LDL ได้โดยไม่จำกัดจำนวน กลายเป็นเซลล์ที่มีไขมันสะสมอยู่เต็มเซลล์เรียกว่าโฟมเซลล์ เม็ดเลือดขาวเหล่านี้เป็นตัวกระตุ้นให้มีการสร้าง ROS เพิ่มขึ้น ซึ่งยิ่งทำให้มี oxidized LDL มากขึ้น พบว่า TMAO ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ oxidized LDL และเกิดโฟมเซลล์มากขึ้น

4. โฟมเซลล์และไขมันจากเซลล์ที่แตกจะสะสมรวมกลุ่มในผนังหลอดเลือด และมีกระบวนการอักเสบตามมา เกิดการสร้างเส้นใยเพื่อการสมานต่าง ๆ จนเกิดเป็นคราบไขมันทับถมที่เรียกว่า plaque ทำให้รูหลอดเลือดแคบลง และเกิดหลอดเลือดตีบตามมาได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งหาก plaque นั้นแตกออกและเกิดการกระตุ้นการสร้างลิ่มเลือด

มีการศึกษาวิจัยพบว่า ในภาวะที่มีความเครียด โกรธ ความดันเลือดสูง หรือการได้รับอาหารที่มีไขมันและคอเลสเตอรอลสูง ภาวะอ้วน โรคเบาหวาน การสูบบุหรี่ จะทำให้มี ROS เพิ่มขึ้น (43) ส่งผลให้ระดับ LDL และ oxidized LDL เพิ่มขึ้น ผนังหลอดเลือดบาดเจ็บง่ายขึ้น จึงเกิด plaque ในผนังหลอดเลือดตามมาได้ง่ายขึ้น ในทางกลับกันการลดความเครียด การเลิกสูบบุหรี่ การออกกำลังกายเพิ่มขึ้น และดื่มน้ำเล็กน้อย จะช่วยให้มีระดับอนุภาคเชิงซ้อนของไขมันและโปรตีนชนิดความ

หนาแน่นสูง หรือที่เรียกว่า high density lipoprotein (HDL) เพิ่มขึ้น ซึ่งจัดเป็นไขมันชนิดดี ถูกออกซิไดส์ได้ยากกว่า LDL หากมีระดับ HDL ในเลือดสูงพบว่าจะลด หรือช่วยป้องกันการเกิด plaque ได้



ภาพที่ 7 แสดงกลไกและความซับซ้อนของการเกิดโรคหลอดเลือดแดงแข็งตัวโดยการสะสมของ oxidized LDL จะกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครเฟจพัฒนาและเคลื่อนที่เข้ามาจับกิน LDL ได้โดยไม่จำกัดจำนวน กลายเป็นเซลล์ที่มีไขมันสะสมอยู่เต็มเซลล์เรียกว่า โฟมเซลล์ (44)

6. ข้อบกพร่องในการซึมผ่านของลำไส้ (gut leakage) และ TMAO reductase

เซลล์เยื่อบุผิวชั้นเดียวในลำไส้จะจับตัวกันโดยเซลล์เยื่อบุผิวที่เรียกว่า tight junctions (TJ) ซึ่งเป็นเกราะป้องกันเยื่อเมือกภายในที่สำคัญระหว่างสิ่งมีชีวิตในโฮสต์และสิ่งมีชีวิตในลำไส้ (46) ในภาวะปกติ TJ จะอนุญาตให้มีการเคลื่อนที่แบบพาสซีฟของโมเลกุลที่เล็กกว่าน้ำหนักโมเลกุล (MW) ที่

0.6 kDa ผ่านการขนส่งแบบพาราเซลล์ลูลาร์ (paracellular transport) (47) การบาดเจ็บของเยื่อเมือกและลำไส้ทำให้เกิดความบกพร่องในการซึมผ่านของลำไส้และเกิดการเคลื่อนย้ายโมเลกุลขนาดใหญ่ของสิ่งมีชีวิตจากลำไส้ไปสู่การไหลเวียนของเลือด เรียกว่า gut leakage (48-52) โดยโมเลกุลเหล่านี้ส่วนใหญ่ที่มาจากการเคลื่อนย้ายจากลำไส้จะทำให้เกิดการตอบสนองของระบบการอักเสบ เนื่องจากแบคทีเรียแกรมลบในลำไส้มีจำนวนมาก การเคลื่อนย้ายของ lipopolysaccharide (LPS) จะทำให้เกิด endotoxemia แสดงให้เห็นถึงผลเสียหลายประการต่อโฮสต์ทั้งในโรคติดเชื้อ (bacterial endotoxemia) หรือโรคที่ไม่ติดเชื้อ (metabolic endotoxemia) (53) จึงนำมาใช้เป็น biomarker สำหรับการประเมินภาวะ gut leakage เนื่องจาก LPS มีขนาดใหญ่เกินกว่าที่จะผ่าน TJ (M.W. 50-100 kDa) (47) การตรวจหา gut leakage โดยใช้ LPS (endotoxemia) ทำได้ง่ายกว่าวิธีมาตรฐานที่ทำการตรวจหาคาร์โบไฮเดรตที่ไม่สามารถดูดซึมได้ในปัสสาวะหรือในซีรัมหลังการกลืนกิน (54) อย่างไรก็ตามอาจมีปัจจัยที่ไม่ได้มาจากลำไส้หลายอย่างอาจทำให้เกิด endotoxemia รวมทั้งการติดเชื้อในกระแสเลือดและการให้สารน้ำทางหลอดเลือดดำที่ปนเปื้อน ดังนั้นผลิตภัณฑ์ของแบคทีเรียอื่น ๆ จึงน่าสนใจที่จะใช้เป็นตัวบ่งชี้ gut leakage

ในทางกลับกันโรคไตเรื้อรังเป็นปัญหาด้านการดูแลสุขภาพที่สำคัญทั่วโลก (55) โดยมีความเป็นไปได้ที่จะเกิด endotoxemia จากการเคลื่อนย้ายของโมเลกุลผ่าน gut leakage (56) ดังนั้นในภาวะยูรีเมีย (uremia) หรือ uremic syndrome (อาการที่เกิดจากไตสูญเสียการทำงานจนทำให้มีของเสียและสารเคมีต่าง ๆ มากมายหลากหลายชนิดสะสมในกระแสเลือด) จึงเป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งของความเสียหายของ TJ ในลำไส้ (57) ซึ่งก่อให้เกิด gut leakage ที่น่าสนใจคือ trimethylamine N-oxide (TMAO) เป็นสารยูรีเมียชนิดหนึ่งที่ได้จากทางเดินอาหาร เกิดจากการเมตาโบไลต์ของฟอสฟาติลโคลีนคือเอมีนออกไซด์ที่มีขนาดเล็กพอสำหรับการขนส่งแบบพาสซีฟผ่าน TJ และเปลี่ยนเป็นสารพิษยูรีเมียในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง (58) ซึ่งเกิดจากการทำงานของไตที่เสื่อมคุณภาพ (59) นอกจากนี้แบคทีเรียในลำไส้ยังสามารถผลิต TMAO reductase (MW ที่ 172 kDa) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้เผาผลาญ TMAO (60,61) โดยปกติจะไม่สามารถเคลื่อนย้ายผ่านลำไส้ในคนที่มีสุขภาพดี (47) ดังนั้นการตรวจหา TMAO reductase ในเลือดอาจเกี่ยวข้องกับ gut leakage ซึ่งแตกต่างจากข้อจำกัดของ LPS (ตัวบ่งชี้ภาวะ endotoxemia) ที่มีโอกาสเกิดการปนเปื้อน LPS ในระหว่างการฟอกเลือด ดังนั้นการตรวจหา TMAO reductase ในซีรัมอาจมีความเฉพาะเจาะจงมากขึ้นสำหรับ gut leakage และการที่ TMAO เกี่ยวข้องกับภาวะแทรกซ้อนทางหลอดเลือดในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง (62-68) ดังนั้น TMAO reductase อาจเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับภาวะแทรกซ้อนของหลอดเลือดของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังด้วย และในการตรวจวัด TMAO reductase ด้วยหลักการ ELISA เป็นวิธีการที่ง่ายกว่าและมีราคาถูกกว่าเมื่อเทียบกับการตรวจวัด TMAO ด้วยหลักการ mass spectrometry ในห้องปฏิบัติการทางคลินิกทั่วไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ระเบียบวิธีวิจัย

1.1 ประเภทของการศึกษาวิจัย

การศึกษาวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิจัยนำร่อง (pilot study)

1.2 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

1.2.1 เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

1. เครื่อง liquid chromatography mass spectrometer Water corporation, สหรัฐอเมริกา
2. เครื่องอ่าน microplate รุ่น Multiskan EX Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
3. เครื่องปั่นเหวี่ยง 3000xg รุ่น 5810 R Eppendorf, เยอรมนี
4. ตู้บ่ม CO2 Incubator รุ่น D-6450 Hanau Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา
5. เครื่องตรวจ VaSera รุ่น VS-2000 Fukuda denshi, ญี่ปุ่น
6. ตู้ปลอดเชื้อ biosafety cabinet รุ่น BSC-04IIA2 Airtech, สาธารณรัฐประชาชนจีน
7. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ รุ่น DM IL LED Leica Microsystems, เยอรมนี
8. เครื่อง vortex mixer รุ่น Genie 2 Scientific Industries, สหรัฐอเมริกา
9. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ รุ่น w-0-350 Memmert, เยอรมนี

1.2.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

1. Pipette tip ขนาด 10-1,000 ไมโครลิตร Eppendorf, เยอรมนี
 2. Multichannel pipette ขนาด 5-300 ไมโครลิตร Eppendorf, เยอรมนี
 3. Cylinders ขนาด 100 มิลลิลิตร และ 1 ลิตร RS Components, เยอรมนี
- หลอดทดลองที่ใช้สำหรับเจือจาง Eppendorf, เยอรมนี

1.2.3 สารเคมีที่ใช้ในการศึกษาวิจัย

1. Deuterated trimethylamine N-oxide (d_9 -TMAO) Merck, เยอรมนี
2. น้ำกลั่นหรือน้ำปราศจากไอออน Ruangwit Medical, ไทย
3. ชุดตรวจ trimethylamine N-oxide reductase ELISA kit MyBioSource, สหรัฐอเมริกา
4. ชุดตรวจ HEK-Blue™ LPS detection Kit InvivoGen, สหรัฐอเมริกา
5. ชุดตรวจ Human IL-6 uncoated ELISA kit Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา

6. ชุดตรวจ Human TNF- α uncoated ELISA kit Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา

2. การพิจารณารับรองจริยธรรม

การศึกษาครั้งนี้ได้รับการอนุมัติการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย กรุงเทพมหานคร ประเทศไทย เลขที่รับรองโครงการ NBC 18/2020

3. ประชากรและลักษณะกลุ่มตัวอย่าง

จากการศึกษา Thai seek study โดยสมาคมโรคไตแห่งประเทศไทยในปี พ.ศ. 2552 โดยอาศัยการคำนวณอัตราการกรองของไต จากสมการ modification of diet in renal disease (MDRD) พบว่ามีความชุกของโรคไตเรื้อรังของประชากรไทยในระยะที่ 1-5 เท่ากับ 17.5% ของประชากร และมีการแจกแจงความชุกของโรคไตเรื้อรังออกเป็นระยะที่ 1, 2, 3, 4, 5 ได้เป็น 3.3%, 5.6%, 7.5%, 0.8% และ 0.3% ตามลำดับ และข้อมูลของสมาคมโรคไตปี พ.ศ.2558 พบว่ามีผู้ป่วยเข้ารับการฟอกเลือด 54,104 ราย

เมื่อนำข้อมูลมาคำนวณจำนวนตัวอย่างทั้งหมดโดยวิธีการทางสถิติ (71) โดยใช้สูตร

$$\text{Total sample size} = N = [(Z_{\alpha} + Z_{\beta})/C]^2 + 3$$

เมื่อกำหนดให้

α = ความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 1 (type I error) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

β = ความคลาดเคลื่อนชนิดที่ 2 (type II error) อำนาจการทดสอบ (power) = 80%

$$\beta = 1 - \text{power of test} = 1 - 0.800 = 0.200$$

The standard normal deviate for $\alpha = Z_{\alpha} = 1.960$

The standard normal deviate for $\beta = Z_{\beta} = 0.842$

r = Estimating effect size = 0.26

$$C = 0.5 * \ln [(1+r)/(1-r)] = 0.266$$

$$\begin{aligned} \text{ดังนั้น } N &= [(1.960 + 0.842)/0.266]^2 + 3 \\ &= 114 \end{aligned}$$

อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาประกอบความเหมาะสมของงบประมาณ จึงได้มีการปรับตัวอย่าง กลุ่มประชากรเป็น 48 ตัวอย่าง ซึ่งเป็นการศึกษาวิจัยแบบนำร่อง (pilot study) ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาเป็นข้อมูลเชิงคุณภาพเพื่อนำไปศึกษาเชิงปริมาณต่อไป โดยเกณฑ์ที่ใช้คัดเลือกผู้ป่วย คือเป็นผู้ป่วยโรคไตระยะสุดท้าย มีค่า eGFR น้อยกว่า 15 มิลลิลิตรต่อนาทีต่อ 1.73 ตารางเมตร ได้รับการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม (hemodialysis) อย่างต่อเนื่องเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 5 ปี อายุ 40 ปีขึ้นไป เพศ ชายหรือหญิง อยู่ในเกณฑ์ไม่น้อยกว่า 40% และไม่เคยมีอาการแทรกซ้อนของภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดมาก่อน ซึ่งเป็นผู้ป่วยของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย โดยทำการเก็บซีรัมปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากผู้ป่วยหลังการได้รับการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม ระหว่างเดือน มกราคม - พฤษภาคม พ.ศ. 2562 และกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีจำนวน 20 ตัวอย่าง โดยใช้เกณฑ์การคัดเลือก คือต้องไม่เป็นโรคไตโดยมีค่า eGFR มากกว่า 90 มิลลิลิตรต่อนาทีต่อ 1.73 ตารางเมตร มีค่าการทำงานของตับ (SGOT, SGPT) และค่าการทำงานของไต (BUN, creatinine) อยู่ในเกณฑ์ปกติ อายุ 40 ปีขึ้นไป เพศ ชายหรือหญิง อยู่ในเกณฑ์ไม่น้อยกว่า 40%

4. วิธีการศึกษาวิจัย

ในการศึกษาวิจัยในซีรัมครั้งนี้ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ 2 ซ้ำ (Duplicates) และหาค่าเฉลี่ยเพื่อความถูกต้องแม่นยำและลดข้อผิดพลาดต่าง ๆ ที่อาจเกิดขึ้นได้ โดยทำการวิเคราะห์ดังต่อไปนี้

4.1 การตรวจวิเคราะห์ serum TMAO

การตรวจวิเคราะห์ serum TMAO ในครั้งนี้ได้รับความช่วยเหลือจาก ศูนย์ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

4.1.1 การเก็บตัวอย่างและการเก็บรักษา

เจาะเลือดใส่หลอด clot blood ปริมาตร 3-5 มิลลิลิตร ตัวอย่างซีรัมต้องแน่ใจว่าการแข็งตัวของเลือด (clot formation) ต้องสมบูรณ์ก่อนปั่นแยก โดยตั้งตัวอย่างทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้องหรือข้ามคืนที่อุณหภูมิ 2-8 °C จากนั้นใช้เครื่องปั่นแยกซีรัมออกจากเม็ดเลือดแดงด้วยความเร็วรอบ 3,000-3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10-15 นาที แบ่งตัวอย่างซีรัมใส่หลอด eppendorf ปริมาตร 500 ไมโครลิตร จำนวนตัวอย่างละ 4 หลอด เพื่อหลีกเลี่ยงการละลายตัวอย่างซ้ำ โดยซีรัมมีความคงตัวที่ 2-8 °C ได้ 24 ชั่วโมง และสามารถเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 3 เดือน หรือ -80 °C ได้นาน 6 เดือน (70)

4.1.2 วิธีวิเคราะห์ serum TMAO ด้วยเทคนิค LC/MS/MS

1. การเตรียมตัวอย่าง

นำซีรัมจากข้อ 4.1.1 มาตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้ละลายก่อนทำการทดสอบเป็นเวลาอย่างน้อย 15 นาที หรือจนกว่าจะละลายหมด ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดซีรัมปริมาตร 20 ไมโครลิตร

ลงในหลอด eppendorf ขนาด 1.5 มิลลิลิตร และผสมกับ internal standard ที่ประกอบด้วย d9-TMAO ที่ละลายใน 90% เมทานอล ให้มีความเข้มข้น 10 ไมโครโมล ปริมาณ 80 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันด้วย เครื่องผสมสาร (vortex mixer) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปทำการปั่นแยกที่ 20,000xg ที่ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ตูด supernatants ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ไปทำการวิเคราะห์ serum TMAO ด้วยเทคนิค LC/MS/MS ในขั้นตอนต่อไป

2. การควบคุมคุณภาพ

ก่อนการวิเคราะห์ระดับ serum TMAO ต้องมีการควบคุมคุณภาพของการตรวจวิเคราะห์ serum TMAO โดยการทำให้ QC จำนวน 3 ตัวอย่าง ที่มีความเข้มข้นของ TMAO อยู่ระหว่าง 0.25-20 ไมโครโมล ค่า QC ที่ยอมรับได้ต้องอยู่ช่วงที่กำหนดคือ $100 \pm 10\%$ (66)

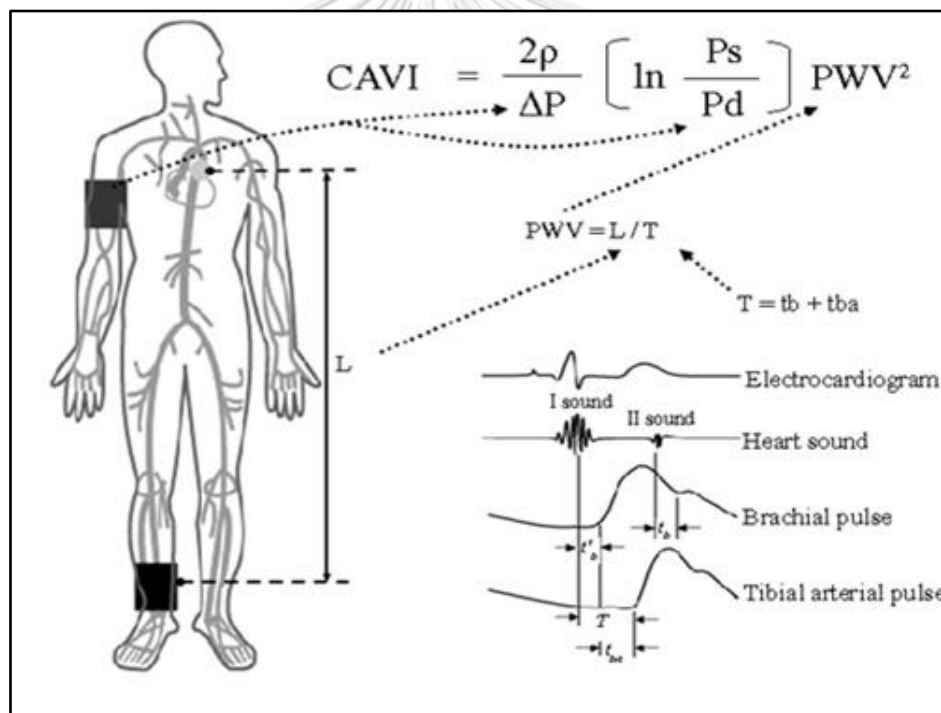
3. การวิเคราะห์ serum TMAO ด้วยเทคนิค LC/MS/MS

ตูด supernatants จากการเตรียมในข้อ 1 ปริมาณ 10 ไมโครลิตร ฉีดลงบนคอลัมน์ ซิลิกา (4.6x250 มิลลิเมตร, 5 ไมโครโมล luna silica; cat# 00G-4274-E0, phenomenex, torrance, Ca) ที่อัตราการไหล 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที โดยใช้ระบบปั๊ม 4 LC-20AD Shimadzu, เซ็นเซอร์อัลตราไวท์ SIL-HTC และระบบเปลี่ยนวาล์วคูลัมน์ (2 Rheodyne 6 port automated valves, Cat# MXP7900, IDEX Health & Science, Oak Harbor, WA) เชื่อมต่อกับ mass spectrometer รุ่น Q-TRAP API 4000 (AB SCIEX, Framingham, MA) การวิเคราะห์แยกสารโดยการผสมตัวทำละลาย A (กรดโพทาไนก 0.1% ในน้ำ) กับตัวทำละลาย B (กรดอะซิติก 0.1% ในเมทานอล) ที่อัตราส่วนต่าง ๆ เริ่มต้นจาก 2% ถึง 100% การวัดปริมาณ TMAO และ d9-TMAO โดยใช้ไอออนโมโนไอออนในโหมดบวก - ไอออน การเปลี่ยน m/z 76-58 amu และ 85-66 amu ตามลำดับ พารามิเตอร์สำหรับการตรวจสอบไอออนมีดังนี้ แรงดันสเปรย์ 4.5 กิโลโวลต์ ม่านแก๊ส 15; GS1, 60; GS2, 50; ก๊าซ CAD, ขนาดกลาง; DP, 60; CE, 25.0 โวลต์สำหรับ TMAO และ 28.3 โวลต์สำหรับ d9-TMAO; CXP, 10; EP, 10. ใช้ไนโตรเจน (ความบริสุทธิ์ 99.95%) เป็นก๊าซเดียว ความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารมาตรฐาน TMAO จะนำมาทำ calibration curves สำหรับหาปริมาณของ serum TMAO ในตัวอย่างต่อไป (66) โดยทำการทดสอบ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย

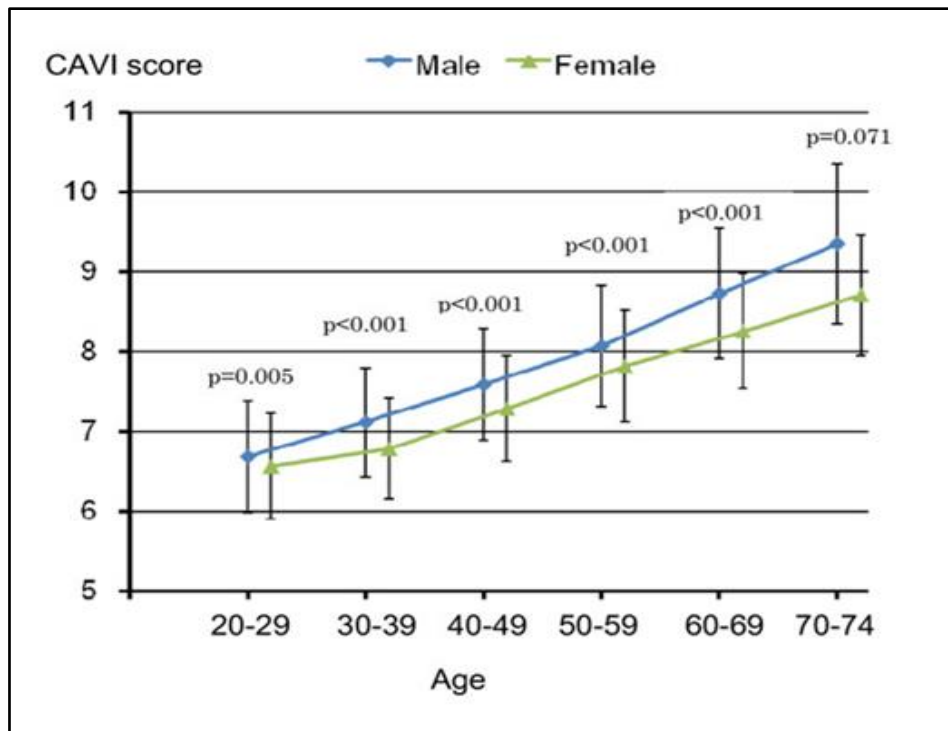
4.2 การตรวจวิเคราะห์ความแข็งตัวของหลอดเลือดด้วยหลักการ ABI และ CAVI

การตรวจวิเคราะห์ในครั้งนี้ได้รับความร่วมมือจาก หน่วยโรคหัวใจและหลอดเลือด ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยใช้เครื่องตรวจ VaSera รุ่น VS-2000 (Fukuda denshi, ญี่ปุ่น) ทำการวัดความยืดหยุ่นของเส้นเลือดในขณะที่ผู้ป่วยนอนราบ หายใจปกติ ไม่มีภาวะเหนื่อยหอบ โดยอาศัยหลักการของ ABI และ CAVI คือความเร็วคลื่นชีพจร pulse wave velocity (PWV) จากหัวใจถึงข้อเท้า เริ่มจากการวัดความยาวจากต้นกำเนิดของเส้นเลือดใหญ่ไป

จนถึงข้อเท้าและนำไปคำนวณโดยใช้สูตร $T = t_b + t_{ba}$ รายละเอียดการตรวจวัดดังนี้ วัดความดันโลหิตที่หลอดเลือดแดงแขน ได้แก่ P_s : ความดันโลหิตค่าบน (systolic) คือแรงดันโลหิตขณะที่หัวใจบีบตัว, P_d : ความดันโลหิตค่าล่าง (diastolic) คือแรงดันโลหิตขณะที่หัวใจคลายตัว, ΔP : $P_s - P_d$, ρ : ความหนาแน่นของเลือด, L : ความยาวจากจุดกำเนิดของหลอดเลือดแดงใหญ่ถึงข้อเท้า, T : เวลาสำหรับคลื่นชีพจรจากลิ้นหลอดเลือดไปที่ข้อเท้า, t_{ba} : เวลาระหว่างการเพิ่มขึ้นของคลื่นชีพจร brachial และการเพิ่มขึ้นของคลื่นชีพจรข้อเท้า, t_b : เวลาระหว่างเสียงปิดวาล์วเอออร์ตาและรอยคลื่นชีพจร brachial, t'_b : เวลาระหว่างเสียงเปิดวาล์วเอออร์ตากับการเพิ่มขึ้นของคลื่นชีพจรแขน (35,36) ดังแสดงในภาพที่ 8 ค่าปกติของ cardio-ankle vascular index (CAVI) โดยแบ่งตามเพศและช่วงอายุต่าง ๆ ดังแสดงในภาพที่ 9 และการใช้เครื่อง VaSera ในการตรวจวัด CAVI ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง ดังแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 8 แสดงการตรวจวัดความยืดหยุ่นของเส้นเลือดโดยอาศัยหลักการ cardio-ankle vascular index (CAVI) (41)



ภาพที่ 9 แสดงค่าปกติของ cardio-ankle vascular index (CAVI) โดยแบ่งตามเพศและช่วงอายุต่าง ๆ (35)



ภาพที่ 10 แสดงการใช้เครื่องในการตรวจวัด CAVI ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง (35)

4.3 การตรวจวิเคราะห์ serum TMAO reductase

นำซีรัมที่เตรียมได้จากข้อ 4.1.1 มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณ serum TMAO reductase ด้วยเทคนิค ELISA โดยชุดตรวจ trimethylamine N-oxide reductase ELISA kit (MyBioSource, สหรัฐอเมริกา) และมีขั้นตอนตามคู่มือของบริษัทผู้ผลิตดังนี้ นำเพลท ELISA ออกมาตามจำนวนหลุมที่ต้องการใช้ทดสอบ เติมน้ำ PBS (pH 7.0-7.2) ในหลุม blank control well ปริมาณ 100 ไมโครลิตร สารมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 0, 5, 10, 25, 50 และ 100 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (เขย่าขวดของแต่ละสารมาตรฐานเบา ๆ ด้วยมือและปิเปตขึ้นและลงสารละลายมาตรฐาน 3 ครั้งก่อนใช้) หลุมละ 100 ไมโครลิตร และตัวอย่างที่ต้องการตรวจวิเคราะห์หลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำ conjugate หลุมละ 50 ไมโครลิตร ยกเว้นหลุม blank control well เขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาแล้วนำไปบ่มที่ 37 °C 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลานำไปล้างด้วย wash solution จำนวน 5 ครั้ง จากนั้นเติมน้ำ substrate A และ substrate B ปริมาณอย่างละ 50 ไมโครลิตร ทุกหลุมปิดฝาแล้วนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 15-20 นาที (หากปฏิกิริยาที่ขึ้นยังไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองให้ทำการบ่มเพิ่ม แต่ไม่เกิน 30 นาที) จากนั้นเติมน้ำ stop solution ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ลงทุกหลุม เขย่าให้เข้ากันนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนของแสงจะแปรผันตรงกับปริมาณ serum TMAO ในสิ่งส่งตรวจ โดยเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน (standard curve) การทดสอบในครั้งนี้น้ำหลุม blank control well สารมาตรฐาน และตัวอย่างทดสอบทำการทดสอบ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย

4.4 การตรวจวิเคราะห์ serum LPS

นำซีรัมที่เตรียมได้จากข้อ 4.1.1 มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณ serum LPS ด้วยเทคนิค ELISA โดยชุดตรวจ HEK-Blue™ LPS detection kit (InvivoGen, สหรัฐอเมริกา) และมีขั้นตอนตามคู่มือของบริษัทผู้ผลิตดังนี้

4.4.1 การละลายเซลล์ HEK-Blue™ -4

นำขวดเซลล์ HEK-Blue™ -4 ที่แช่แข็งมาละลาย โดยการวนเบา ๆ ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 °C ประมาณ 2 นาที (การละลายควรเป็นไปอย่างรวดเร็ว) ในขณะที่นำขวดเซลล์ให้ยก O-ring และฝาออกจากน้ำ เพื่อป้องกันการปนเปื้อน เมื่อครบกำหนดเวลานำขวดเซลล์ HEK-Blue™ -4 ออกจากอ่างน้ำทันทีและฉีดพ่นด้วย 70% เอทานอล เพื่อขจัดสิ่งปนเปื้อนออก จากนั้นค่อย ๆ ย้ายเซลล์ลงในหลอดปราศจากเชื้อที่บรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ 20 มิลลิลิตร และนำไปปั่น 1,000-1,200 รอบต่อนาที (RCF = 200-300g) เป็นเวลา 5 นาที เติมน้ำส่วนบนออก เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงไปในเซลล์ เขย่าเบา ๆ จากนั้นดูดเซลล์ทั้งหมดไปยังขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 หรือ 75 ตารางเซนติเมตร ที่ภายในบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ 15 มิลลิลิตร นำขวดเซลล์ที่ได้เก็บในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C 5% CO₂ ไว้ข้ามคืน ติดตามการเจริญเติบโตของเซลล์โดยการสังเกตทุกวันด้วย

กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ เมื่อเซลล์มีปริมาณได้ 50-80% confluency ให้ปรับจำนวนเซลล์ให้มีปริมาณ $1-5 \times 10^5$ เซลล์/มิลลิลิตร ด้วยทริปซิน จากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็น selection medium (growth medium supplemented with 1X HEK-Blue™ selection)

4.4.2 การเตรียมตัวอย่าง

ต้องใช้เทคนิคอย่างระมัดระวังเพื่อหลีกเลี่ยงเชื้อจุลชีพหรือการปนเปื้อนของ endotoxin วัสดุทั้งหมดที่สัมผัสกับตัวอย่าง ต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) ก่อนใช้ทุกครั้ง เพื่อให้ปราศจาก endotoxin ตัวอย่างที่จะทดสอบควรเก็บไว้ที่ 2-8 °C หรือแช่แข็งเพื่อหยุดการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งหมดที่ระดับ endotoxin อาจเพิ่มขึ้นตามเวลา ทำการเจือจางแบบอนุกรมสามเท่าของตัวอย่างทดสอบ ดังนี้

1. เตรียมเพลทสำหรับการเจือจางตัวอย่างทดสอบ (dilution plate) ดังแสดงในภาพที่ 11 โดยดูด endotoxin-free water ใส่ในหลุม A2-A9 หลุมละ 140 ไมโครลิตร และหลุม A10 ปริมาณ 210 ไมโครลิตร ดูดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาณ 210 ไมโครลิตร ลงในหลุม A1 จากนั้นดูดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบในหลุม A1 ปริมาณ 70 ไมโครลิตร ผสมลงในหลุม A2 ผสมให้เข้ากัน ดูดตัวอย่างที่ต้องการทดสอบในหลุม A2 ปริมาณ 70 ไมโครลิตร ผสมลงในหลุม A3 ผสมให้เข้ากัน ทำแบบเดียวกันจนถึงหลุม A9

2. ทำการเจือจาง endotoxin standard ลงในหลุม C โดยดูด endotoxin-free water ใส่ในหลุม C2-C9 หลุมละ 100 ไมโครลิตร และหลุม C10 ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ดูด endotoxin standard เข้มข้น 1.0 EU/มิลลิลิตร ปริมาณ 200 ไมโครลิตร ลงในหลุม C1 จากนั้นดูด endotoxin standard ในหลุม C1 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมลงในหลุม C2 ผสมให้เข้ากัน ดูดตัวอย่างทดสอบในหลุม C2 ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ผสมลงในหลุม C3 ผสมให้เข้ากัน ทำแบบเดียวกันจนถึงหลุม C9 ตามตารางที่ 4

4.4.3 ขั้นตอนการทดสอบ

1. วันแรกของการทดสอบ

เตรียมเพลทสำหรับการทดสอบ (test plate) ดังแสดงในภาพที่ 11 ดูดตัวอย่างทดสอบหลุม A1 จากเพลท (dilution plate) ที่เตรียมในข้อ 4.4.2 ข้อ 1 ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงในหลุม A1 และ B1 ทำแบบเดียวกันจาก A2 จนถึงหลุม A10 ดูด endotoxin standard หลุม C1 จากเพลท (dilution plate) ที่เตรียมในข้อ 4.4.2 ข้อ 1 ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ลงในหลุม C1 ทำแบบเดียวกันจาก C2 จนถึงหลุม C10 จากนั้นหลุมทดสอบ A1 ถึง A10 เติม endotoxin-free water ปริมาณ 20 ไมโครลิตร หลุม B1 ถึง B10 ของเพลททดสอบ เติม สารละลาย HEK-Blue™ endotoxin standard spike 0.1 EU/มิลลิลิตร ปริมาณ 20 ไมโครลิตร หลุม C1 ถึง C10 ของเพลททดสอบ เติม endotoxin-free water ปริมาณ 20 ไมโครลิตร จากนั้นใส่เซลล์ HEK-Blue™ -4 ($1-5 \times 10^5$ เซลล์/

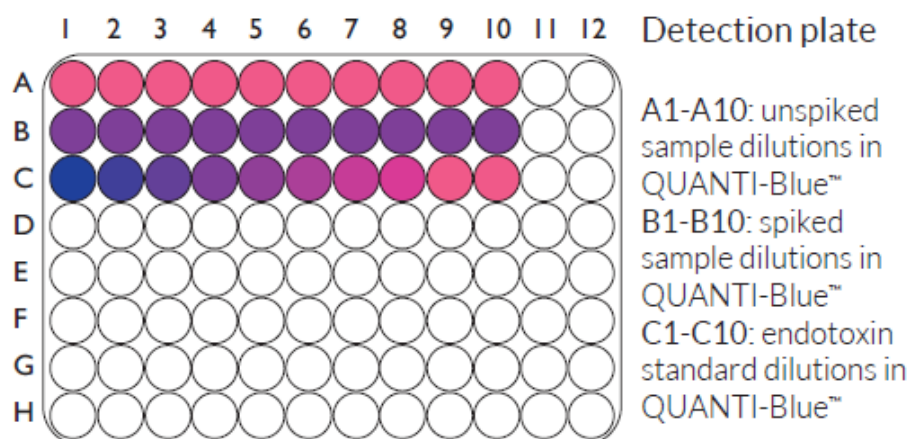
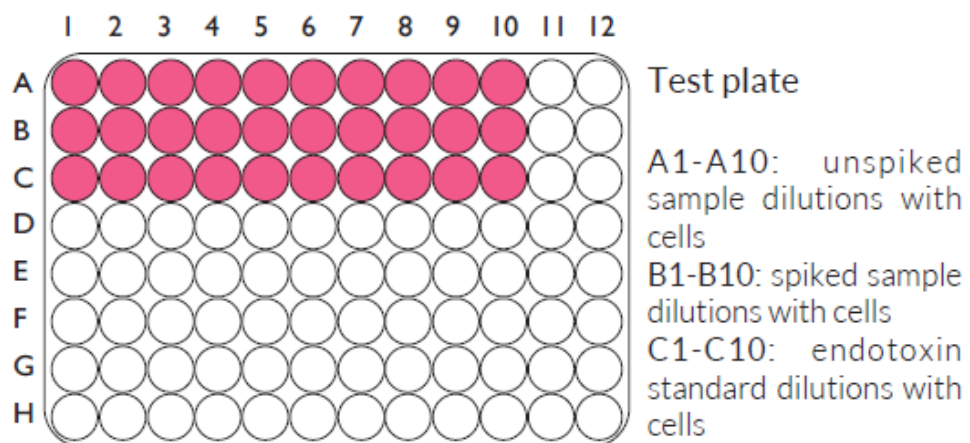
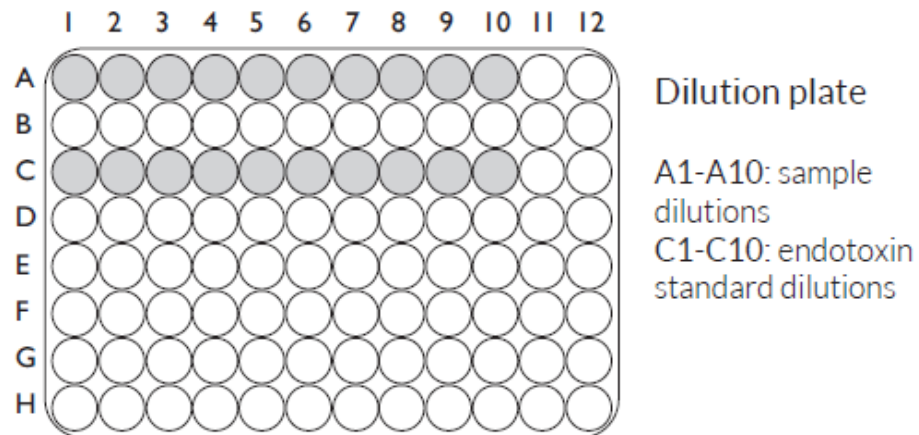
มิลลิลิตร) ที่เตรียมไว้จากข้อ 4.4.1 ลงไปในหลุม A1-C10 หลุมละ 160 ไมโครลิตร (สูงสุด 50,000 เซลล์) โดยต้องเปลี่ยนทิปใหม่ทุกครั้งสำหรับแต่ละหลุมเพื่อหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนข้ามกัน บ่มเพลททดสอบในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C 5% CO₂ เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

2. วันที่สองของการทดสอบ

เตรียม QUANTI-Blue™ และอุ่นที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที ก่อนใช้ ดูด supernatant ปริมาณ 20 ไมโครลิตร จากแต่ละหลุม A1-C10 จากเพลททดสอบ (test plate) ลงในหลุม A1-C10 เพลทใหม่ (detection plate) เติม QUANTI-Blue™ ปริมาณ 180 ไมโครลิตร และบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 1-6 ชั่วโมง จากนั้นนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ดังแสดงในภาพที่ 11

ตารางที่ 4 แสดงการเจือจางแบบอนุกรมสามเท่าของตัวอย่างและสารมาตรฐาน endotoxin

Well	Sample	Endotoxin-free water	Sample dilution	Well	Endotoxin standard	Endotoxin-free water	Final concentration
A1	210 μ l of sample	-	Direct	C1	200 μ l of 1.0 EU/ml endotoxin standard	-	1 EU/ml
A2	70 μ l from well A1	140 μ l	1/3	C2	100 μ l from well C1	100 μ l	0.5 EU/ml
A3	70 μ l from well A2	140 μ l	1/9	C3	100 μ l from well C2	100 μ l	0.25 EU/ml
A4	70 μ l from well A3	140 μ l	1/27	C4	100 μ l from well C3	100 μ l	0.125 EU/ml
A5	70 μ l from well A4	140 μ l	1/81	C5	100 μ l from well C4	100 μ l	0.062 EU/ml
A6	70 μ l from well A5	140 μ l	1/243	C6	100 μ l from well C5	100 μ l	0.031 EU/ml
A7	70 μ l from well A6	140 μ l	1/729	C7	100 μ l from well C6	100 μ l	0.016 EU/ml
A8	70 μ l from well A7	140 μ l	1/2187	C8	100 μ l from well C7	100 μ l	0.008 EU/ml
A9	70 μ l from well A8	140 μ l	1/6561	C9	100 μ l from well C8	100 μ l	0.004 EU/ml
A10	-	210 μ l	-	C10	-	200 μ l	-



ภาพที่ 11 อธิบายการเตรียมการเจือจางแบบอนุกรมสามเท่าของตัวอย่างทดสอบและ endotoxin standard dilutions plate, test plate และ detection plate ตามลำดับ

4.4.4 การคำนวณความเข้มข้นของ endotoxin

พล็อตค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ของสารมาตรฐาน endotoxin HEK-Blue™ โดยการเจือจางสารมาตรฐานบนแกน y เทียบกับค่าที่สอดคล้องกับความเข้มข้นของ endotoxin (EU/มิลลิลิตร) บนแกน x ใส่เส้นแนวโน้มเชิงเส้นตรงกับจุดเหล่านี้และแสดงสมการและค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (ค่า R-squared; R^2) ในแผนภูมิ โดยที่ความเป็นเชิงเส้นของเส้นโค้งมาตรฐาน endotoxin HEK-Blue™ ภายในช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทำนายค่า endotoxin มีความน่าเชื่อถือเมื่อค่า R^2 ไม่น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.98 โดยต้องมีความเข้มข้นของสารมาตรฐาน 4 ระดับครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ เลือกค่า y หนึ่งหรือหลายค่าของการเจือจางตัวอย่างที่เป็นในช่วงเชิงเส้นของเส้นโค้งมาตรฐาน HEK-Blue™ endotoxin และคำนวณค่า x ที่สอดคล้องกันในการตรวจสอบความเข้มข้นของ endotoxin ของตัวอย่างให้คูณค่า x ที่ได้จากปัจจัยการเจือจางตามลำดับ ทำการทดสอบ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย

4.5 การตรวจวิเคราะห์ serum cytokine (serum IL-6, serum TNF- α)

นำซีรัมที่เตรียมได้จากข้อ 4.1.1 มาทำการวิเคราะห์หาปริมาณ serum IL-6 และ serum TNF- α ด้วยเทคนิค ELISA โดยชุดตรวจ Human IL-6 uncoated ELISA kit และชุดตรวจ Human TNF- α uncoated ELISA kit (Thermo Scientific, สหรัฐอเมริกา) และมีขั้นตอนตามคู่มือของบริษัทผู้ผลิตดังนี้

4.5.1 การเตรียมน้ำยาก่อนการทดสอบดังนี้

1. 1xCoating buffer: เจือจาง PBS (10x) ในน้ำปราศจากไอออน (deionized water) ในอัตราส่วน 1:10
2. Capture antibody: เจือจาง capture antibody (250x) ใน 1xcoating buffer ในอัตราส่วน 1:250
3. 5xELISA/ELISPOT diluent: เจือจาง diluent concentrate (5x) ใน deionized water ในอัตราส่วน 1:5
4. Detection antibody: เจือจาง detection antibody (250x) ใน 1xELISA/ELISPOT ในอัตราส่วน 1:250
5. เอนไซม์ streptavidin-HRP: เจือจาง streptavidin-HRP (100x) ใน 1xELISA/ELISPOT ในอัตราส่วน 1:100

4.5.2 วิธีการทดสอบ

เติม antibody ที่ต้องการทดสอบปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในเพลท ปิดเพลทด้วยแผ่นพลาสติกและบ่มค้างคืนที่อุณหภูมิ 2-8 °C เปิดแผ่นพลาสติกออกและล้างด้วย wash buffer

ปริมาณ 250 ไมโครลิตรต่อหลุม ใช้เวลาในการแช่ประมาณ 1 นาที จากนั้นเท wash buffer ที่จับบนกระดาดยี่ห้อทำการล้าง 3 ครั้ง เติม diluent ปริมาณ 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เติม diluent ในหลุม blank สารมาตรฐาน และตัวอย่างที่ต้องการตรวจวิเคราะห์หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง เติม biotin-conjugated anti human antibody ที่ต้องการทดสอบ หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย wash buffer 3 ครั้ง เติม streptavidin-HRP หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ทำการล้างด้วย wash buffer 5-7 ครั้ง เติม TMB solution ปริมาณ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม stop solution ปริมาณ 100 ไมโครลิตร นำไปอ่านการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร แล้วลบค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ออกจาก 450 นาโนเมตร และวิเคราะห์ข้อมูล ทำการทดสอบ 2 ซ้ำและนำมาหาค่าเฉลี่ย

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้วิเคราะห์โดยใช้ซอฟต์แวร์ statistical package for social sciences (SPSS 22.0, SPSS Inc., IL, USA) และซอฟต์แวร์ graph pad prism เวอร์ชัน 7.0 (La Jolla, CA, USA) แสดงเป็นค่าเฉลี่ย mean \pm standard error (SE) ความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้รับการตรวจสอบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว one-way analysis of variance (one-way ANOVA) ตามด้วยการวิเคราะห์ของ Tukey's analysis sinv Student's t-test สำหรับการเปรียบเทียบหลายกลุ่มหรือ 2 กลุ่มตามลำดับ และการวิเคราะห์ของ pearson correlation สำหรับหาสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) โดย $p < 0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

ผลการทดลอง

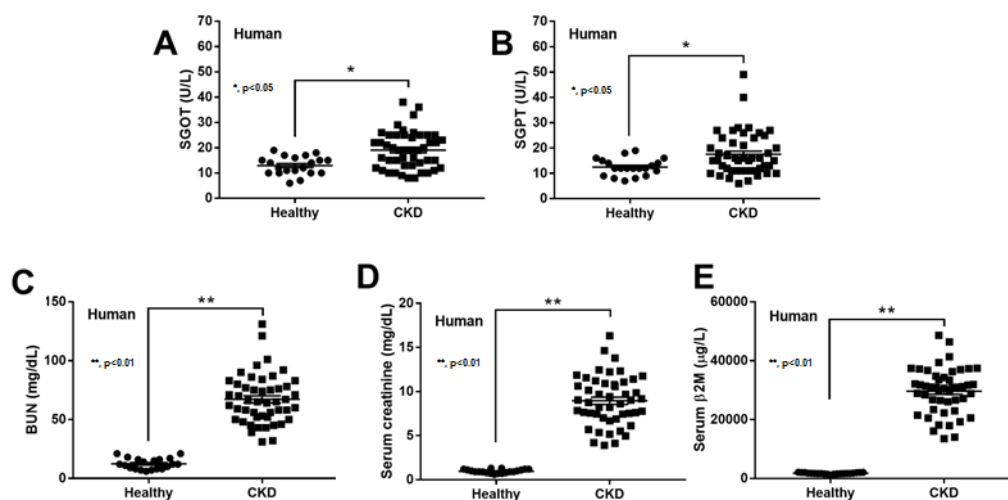
1. ข้อมูลผู้ป่วย

สำหรับข้อมูลประชากรของกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีจำนวน 20 คน เป็นเพศชายจำนวน 8 คน (40%) เพศหญิงจำนวน 12 คน (60%) และผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังจำนวน 48 คน เป็นเพศชายจำนวน 22 คน (46%) เพศหญิงจำนวน 26 คน (54%) นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) แล้วนำมาเปรียบเทียบกันดังต่อไปนี้ (กลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีเทียบกับกลุ่มผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง) อายุเฉลี่ย 57 ± 15 เทียบกับ 65 ± 12 ปี ความสูง 171 ± 10 เทียบกับ 160 ± 9 เซนติเมตร และดัชนีมวลกาย (BMI) 28 ± 10 เทียบกับ 25 ± 8 โดยที่ระยะเวลาการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียมของผู้ป่วยและน้ำหนักตัวหลังได้รับการฟอกเลือดคือ 11 ± 5 ปี และ 61 ± 15 กิโลกรัม โรคประจำตัวของผู้ป่วย ได้แก่ โรคไตจากเบาหวาน 24 คน (50%) ความดันโลหิตสูง 8 คน (17%) โรคไตอักเสบ 4 คน (8%) และไม่ทราบสาเหตุ 12 คน (25%) ดังแสดงในตารางที่ 5

เมื่อนำตัวอย่างเลือดจากผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่เข้ารับการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียมเป็นประจำ และกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีมาทำการวิเคราะห์แบบตัดขวางโดยวัดค่าการทำงานของตับ (serum glutamic-oxaloacetic transaminase; SGOT และ serum glutamate-pyruvate transaminase; SGPT) (ค่าปกติ <40 ยูนิต/ลิตร) ในทางคู่ขนานได้ทำการวิเคราะห์สารพิษทั้งหมดของภาวะ uremia toxin ดังนี้ สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ได้แก่ BUN และ creatinine สารที่มีโมเลกุลขนาดกลาง ได้แก่ beta-2 microglobulin (B2M) แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน พบว่าในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีระดับ SGOT และ SGPT สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ในขณะที่ระดับ BUN, creatinine และ B2M สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 ดังแสดงในภาพที่ 12

ตารางที่ 5 แสดงข้อมูลทั่วไปของกลุ่มตัวอย่าง

ค่าพารามิเตอร์ของกลุ่มตัวอย่าง	กลุ่มควบคุม (n=20)	กลุ่มผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง (n=48)
อายุ (mean \pm SD) (ปี)	56.8 \pm 15.3	64.7 \pm 12.1
เพศ, จำนวน (%)		
ชาย	8 (40)	22 (46)
หญิง	12 (60)	26 (54)
น้ำหนักตัวหลังการฟอกเลือด (mean \pm SD) (กก.)	ไม่มี	61.1 \pm 15.4
ส่วนสูง (mean \pm SD) (ซม.)	171.2 \pm 10.2	160.3 \pm 9.2
ดัชนีมวลกาย (mean \pm SD)	28.3 \pm 9.7	25.3 \pm 7.5
ระยะเวลาการฟอกเลือด (mean \pm SD) (ปี)	ไม่มี	11.3 \pm 5.3
โรคไตขั้นต้น, จำนวน (%)	ไม่มีโรคประจำตัว	
เบาหวาน		24 (50)
ความดันโลหิตสูง		8 (17)
ไตอักเสบ		4 (8)
ไม่ทราบสาเหตุ		12 (25)



* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

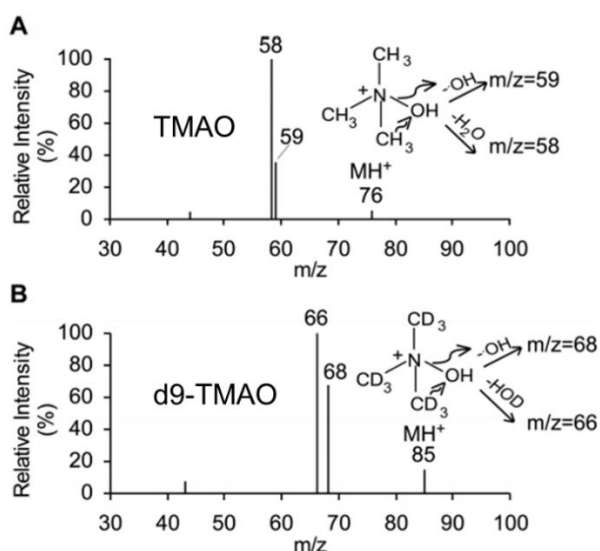
** หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01

ภาพที่ 12 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะทางคลินิกในเลือดระหว่างกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (n = 20) และผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง (n = 48) ตามที่กำหนดโดย 1) สถานะของตับ SGOT และ SGPT (A, B), 2) สารพิษในปัสสาวะของโมเลกุลขนาดเล็ก (BUN และ creatinine) (C, D) และโมเลกุลขนาดกลาง (beta-2 microglobulin) (E)

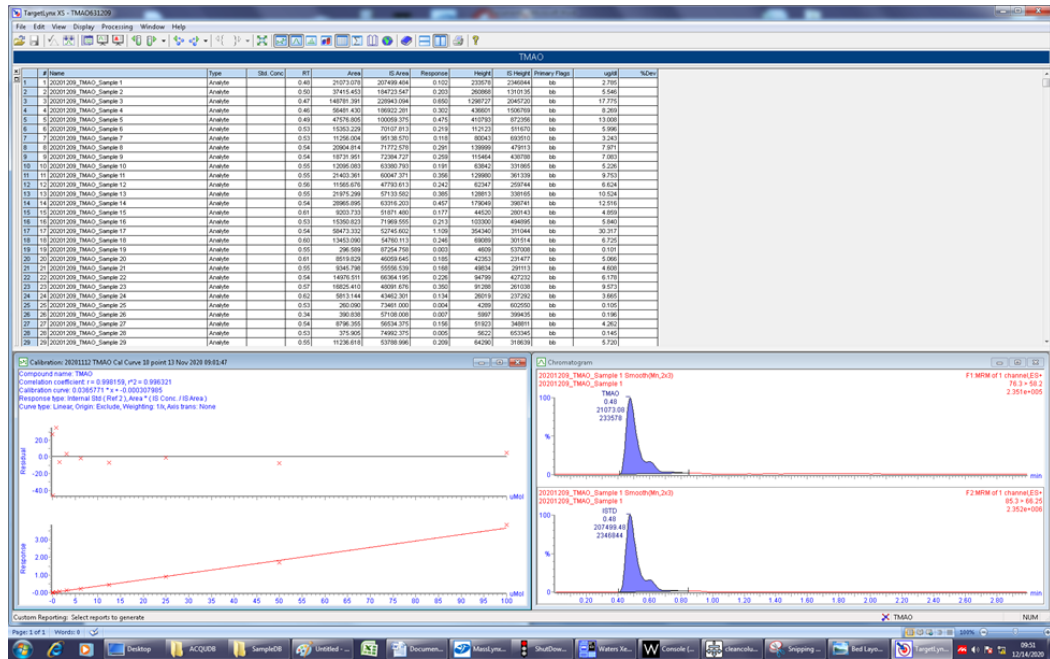
2. ผลการวิเคราะห์ serum TMAO

การวิเคราะห์ serum TMAO ด้วยหลักการ LC/MS/MS เมื่อให้สารตัวอย่างเข้าสู่ส่วนผลิตไอออน (ion source) ของเครื่อง mass spectrometer โมเลกุลของสารจะได้รับพลังงาน ทำให้เกิด ionization กลายเป็นไอออน ดังแสดงในภาพที่ 13 จากนั้นไอออนต่าง ๆ จะถูกส่งผ่านเข้าสู่ส่วนวิเคราะห์มวล (mass analyzer) ซึ่งจะทำการแยกไอออนทั้งหลายออกจากกันตามค่ามวลต่อประจุ (mass-to-charge ratio หรือ m/z) ของไอออนแต่ละชนิด จากนั้นไอออนซึ่งผ่านการแยกมวลแล้ว จะถูกส่งผ่านเข้าไปสู่ส่วนตรวจวัด (detector) ซึ่งส่วนนี้จะทำหน้าที่ตรวจวัดปริมาณของไอออนแต่ละชนิด ที่ผ่านเข้ามาทำการประมวลผลและแสดงข้อมูลออกมาในรูปแบบของ mass spectrum ซึ่งเป็นกราฟที่แสดงปริมาณของไอออนเหล่านี้ต่อค่ามวลต่อประจุของไอออนแต่ละชนิดนั้น ๆ โดยผ่านโปรแกรม TargetLynx™ application manager ที่ใช้ดำเนินการเก็บข้อมูลตัวอย่างการประมวลผลและการรายงานผลลัพธ์เชิงปริมาณโดยอัตโนมัติ ได้แก่ serum TMAO ที่ต้องการตรวจวัด และสารมาตรฐาน d9-TMAO โดยในการวิเคราะห์ระดับ serum TMAO ให้ใช้ตัวอย่างการควบคุมคุณภาพ (QC) 3 ตัวอย่าง ที่มีความเข้มข้นของระดับ TMAO อยู่ระหว่าง 0.25-20 ไมโครโมล ซ้ำกันก่อน ความเข้มข้นของ serum TMAO เป็นที่ยอมรับได้เมื่อความถูกต้องของค่าที่กำหนดจากตัวอย่าง QC อยู่ภายใน

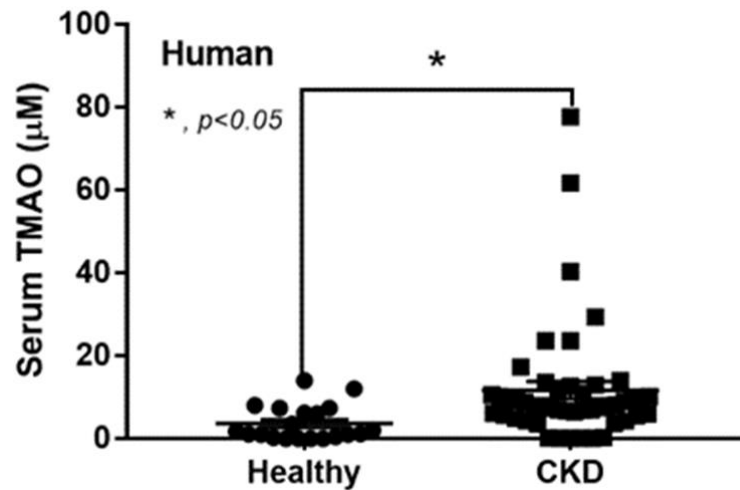
100 ± 10% (66) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ดังแสดงในภาพที่ 14 จากนั้นเมื่อได้ค่า serum TMAO ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง นำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี โดยพบว่าในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีระดับ serum TMAO สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 13 แสดงการแตกตัวของสาร TMAO (MW 76) (A) และการแตกตัวของสารมาตรฐาน d9-TMAO (MW 85) (B) เมื่อเข้าสู่ส่วนผลิตไอออน (ion source) ของเครื่อง mass spectrometer



ภาพที่ 14 แสดงตัวอย่างกราฟและข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ serum TMAO ของเครื่อง mass spectrometer รุ่น Q-TRAP API 4000 (AB SCIEX, Framingham, MA) ผ่านโปรแกรม TargetLynx™ application manager

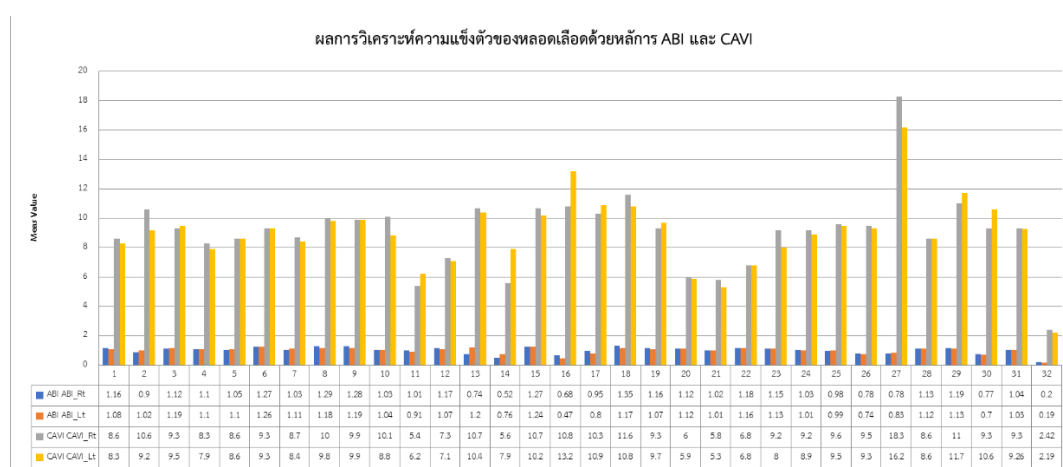


* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ภาพที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบ serum trimethylamine N-oxide (TMAO) ระหว่างกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี (n = 20) และผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง (n = 48)

3. ผลการวิเคราะห์ความแข็งตัวของหลอดเลือดด้วยหลักการ ABI และ CAVI

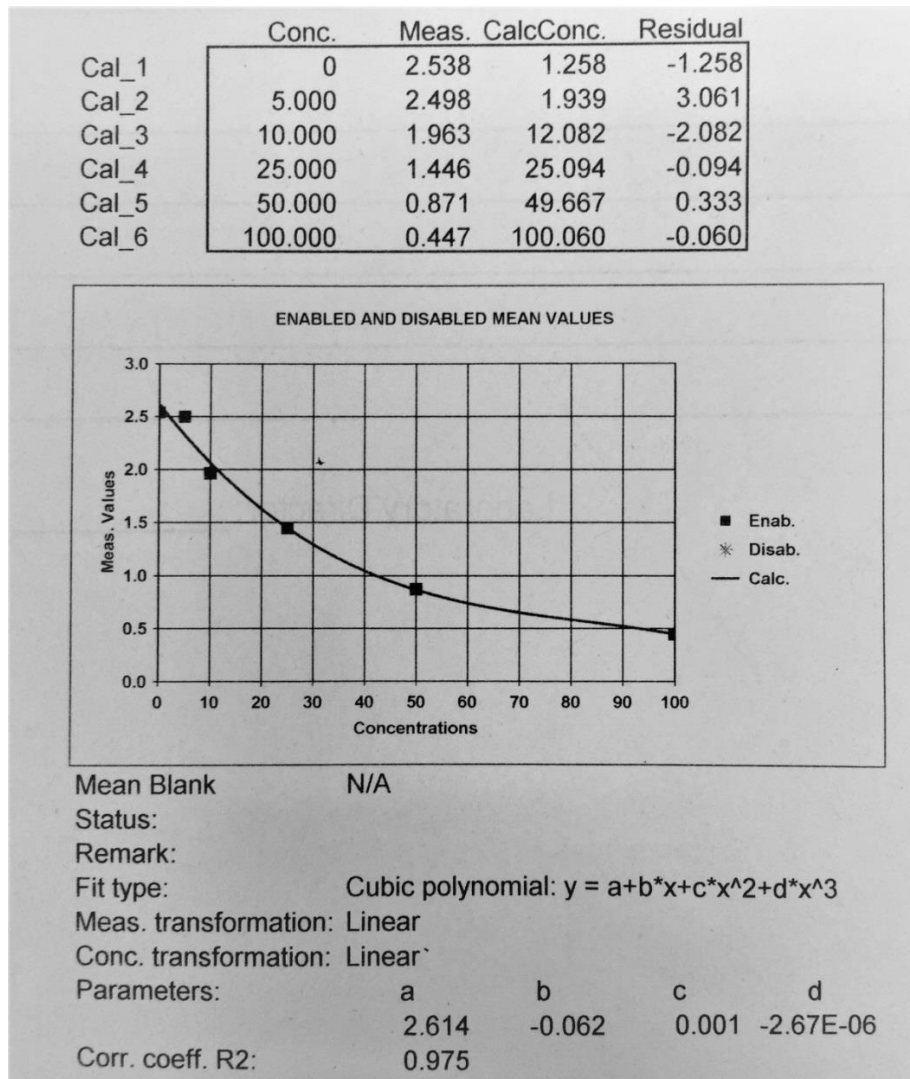
ผลการวิเคราะห์ค่าความแข็งตัวของหลอดเลือดด้วยหลักการ ABI และ CAVI ผ่านเครื่องตรวจ VaSera รุ่น VS-2000 (Fukuda denshi, ญี่ปุ่น) โดยทำการวัดความยืดหยุ่นของเส้นเลือดในขณะที่ผู้ป่วยนอนราบ หายใจปกติ แล้วนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยต่อไป ซึ่งการตรวจวิเคราะห์ทีนี้ครั้งนี้ได้รับความร่วมมือจาก หน่วยโรคหัวใจและหลอดเลือด ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยแสดงผลที่ได้ตามภาพที่ 16



ภาพที่ 16 แสดงผลการวิเคราะห์ความแข็งตัวของหลอดเลือดด้วยหลักการ ABI และ CAVI (n = 32)

4. ผลการวิเคราะห์ serum TMAO reductase

การวิเคราะห์ serum TMAO reductase นี้ได้ใช้หลักการ ELISA ซึ่งนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนของแสงจะแปรผันตรงกับปริมาณ serum TMAO ในสิ่งส่งตรวจ โดยเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน (standard curve) ดังแสดงในภาพที่ 17 และการวิเคราะห์ serum TMAO reductase ซึ่งได้ทำการตรวจวิเคราะห์ 2 ซ้ำแล้วหาค่าเฉลี่ย ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 18



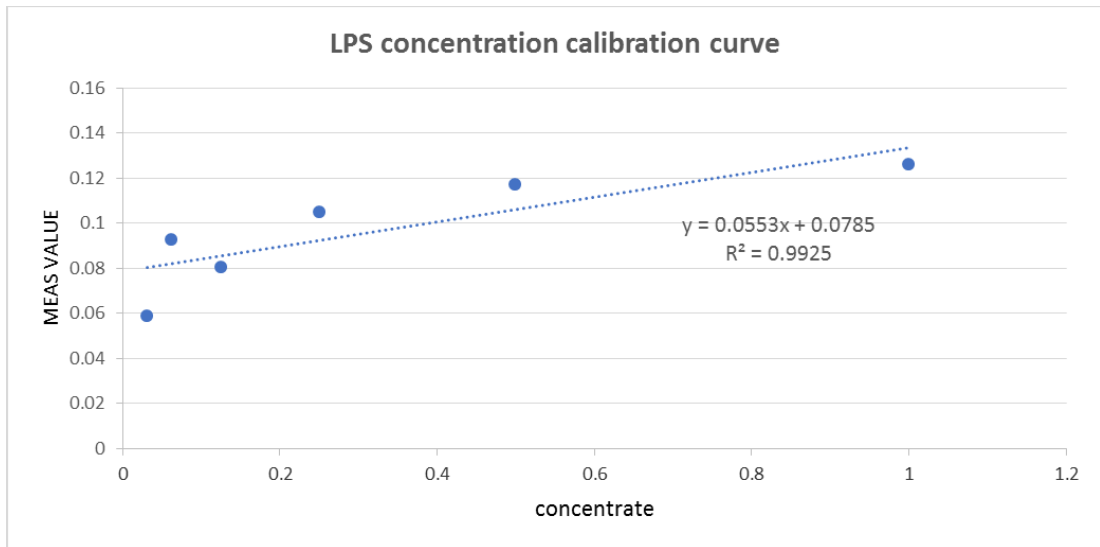
ภาพที่ 17 แสดงกราฟของสารมาตรฐาน TMAO reductase ด้วยหลักการ ELISA $R^2=0.975$

Calibrators and samples Sheet: TMAO, Assay: Assay1									
Name	Meas.	Calc.	Dil. factor	Result	SD	CV-%	Comment	Comment 2	
Blank	0.047	<min	1.0	#VALUE!					
	0.049	<min	1.0	#VALUE!					
	0.048			#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!			
Cal_1	2.480	2.236	1.0	2.24					
	2.596	>max	1.0	#VALUE!					
	2.538			#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!			
Cal_2	2.518	1.593	1.0	1.59					
	2.477	2.287	1.0	2.29					
	2.498			1.94	0.491	25.30			
Cal_3	1.881	13.866	1.0	13.87					
	2.044	10.373	1.0	10.37					
	1.963			12.12	2.470	20.38			
Cal_4	1.417	25.962	1.0	25.96					
	1.474	24.246	1.0	24.25					
	1.446			25.10	1.213	4.83			
Cal_5	0.855	50.707	1.0	50.71					
	0.886	48.664	1.0	48.66					
	0.871			49.69	1.444	2.91			
Cal_6	0.454	99.215	1.0	99.21					
	0.440	<min	1.0	#VALUE!					
	0.447			#VALUE!	#VALUE!	#VALUE!			
Un1	2.184	7.590	1.0	7.59					
	2.128	8.681	1.0	8.68					
	2.156			8.14	0.772	9.49			
Un2	2.242	6.488	1.0	6.49					
	2.272	5.929	1.0	5.93					
	2.257			6.21	0.395	6.37			
Un3	1.640	19.666	1.0	19.67					
	1.653	19.330	1.0	19.33					
	1.647			19.50	0.238	1.22			
Un4	1.894	13.576	1.0	13.58					
	1.916	13.091	1.0	13.09					
	1.905			13.33	0.344	2.58			
Un5	2.115	8.939	1.0	8.94					
	2.066	9.923	1.0	9.92					
	2.091			9.43	0.696	7.38			
Un6	2.079	9.660	1.0	9.66					
	1.886	13.755	1.0	13.75					
	1.983			11.71	2.896	24.73			
Un7	2.024	10.786	1.0	10.79					
	2.044	10.373	1.0	10.37					
	2.034			10.58	0.292	2.76			

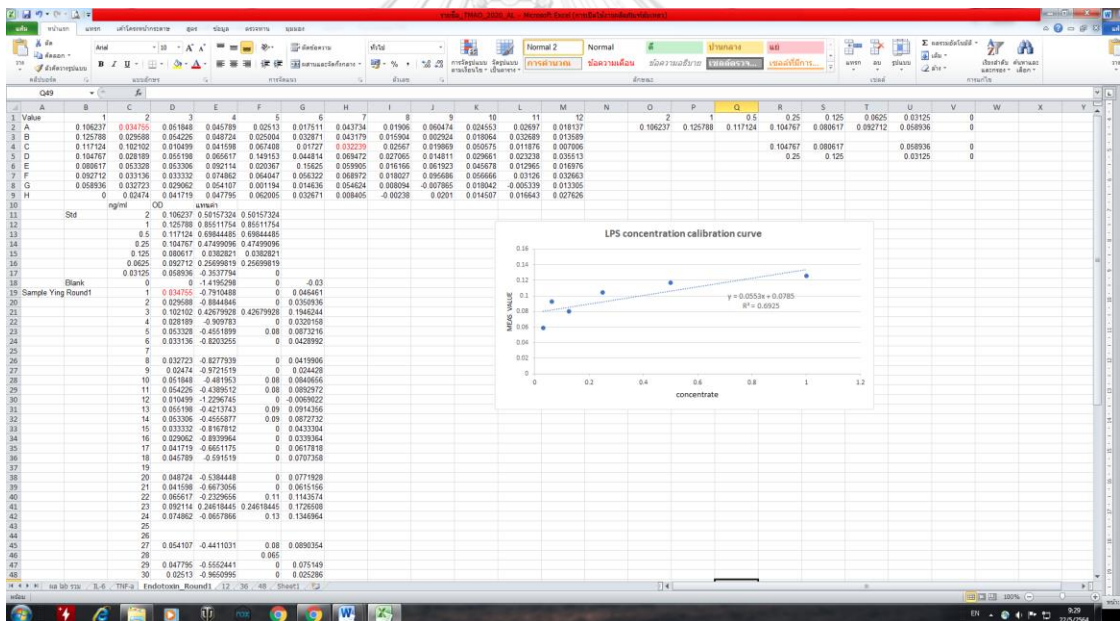
ภาพที่ 18 แสดงตัวอย่างการวิเคราะห์ serum TMAO reductase ด้วยหลักการ ELISA

5. ผลการตรวจวิเคราะห์ serum LPS

การวิเคราะห์ serum LPS นี้ได้ใช้หลักการ ELISA แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ซึ่งค่าการดูดกลืนของแสงจะแปรผันตรงกับปริมาณ LPS ในสิ่งส่งตรวจ โดยเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน (standard curve) ดังแสดงในภาพที่ 19 และการวิเคราะห์ serum LPS ซึ่งได้ทำการตรวจวิเคราะห์ 2 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ย ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 20



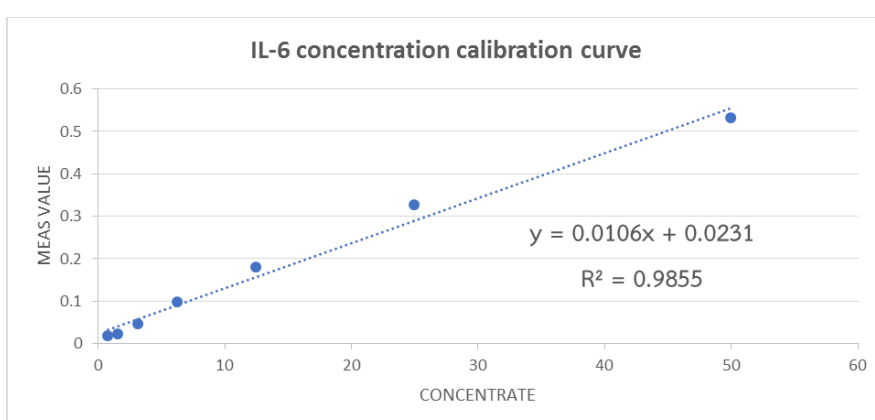
ภาพที่ 19 แสดงกราฟของสารมาตรฐาน LPS (standard curve) ด้วยหลักการ ELISA โดยที่สมการเชิงเส้น $y=0.0553x + 0.0785, R^2=0.9925$



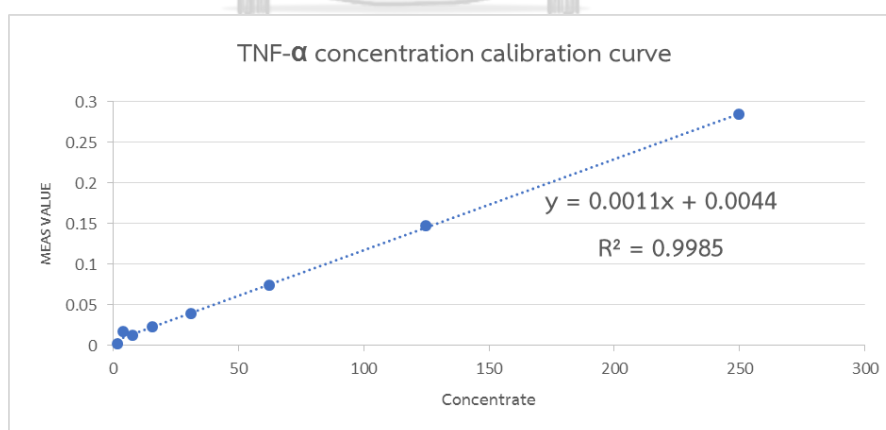
ภาพที่ 20 แสดงตัวอย่างการวิเคราะห์ serum LPS ด้วยหลักการ ELISA โดยใช้ฟังก์ชัน FORECAST ในโปรแกรม Microsoft excel ค่าการดูกลืนของแสงจะแปรผันตรงกับปริมาณ serum LPS ในสิ่งส่งตรวจโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

6. ผลการตรวจวิเคราะห์ serum cytokine (serum IL-6, serum TNF- α)

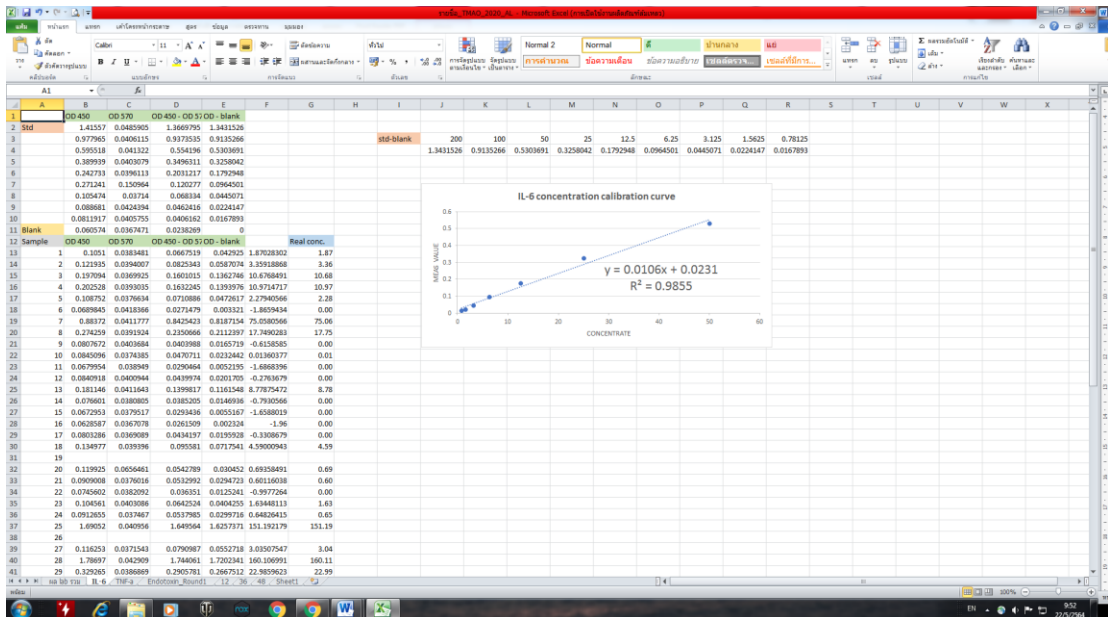
การตรวจวิเคราะห์ serum cytokine ได้แก่ serum IL-6 และ serum TNF- α ใช้หลักการ ELISA แล้วในขั้นตอนสุดท้าย นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร แล้วลบค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ออกจาก 450 นาโนเมตร และวิเคราะห์ข้อมูลโดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ซึ่งได้ทำการตรวจวิเคราะห์ 2 ชั่วโมงแล้วหาค่าเฉลี่ย โดยกราฟมาตรฐานของ IL-6 และ TNF- α แสดงในภาพที่ 21 และ 22 ตามลำดับ และตัวอย่างการวิเคราะห์ serum IL-6 และ serum TNF- α แสดงในภาพที่ 23 และ 24 ตามลำดับ



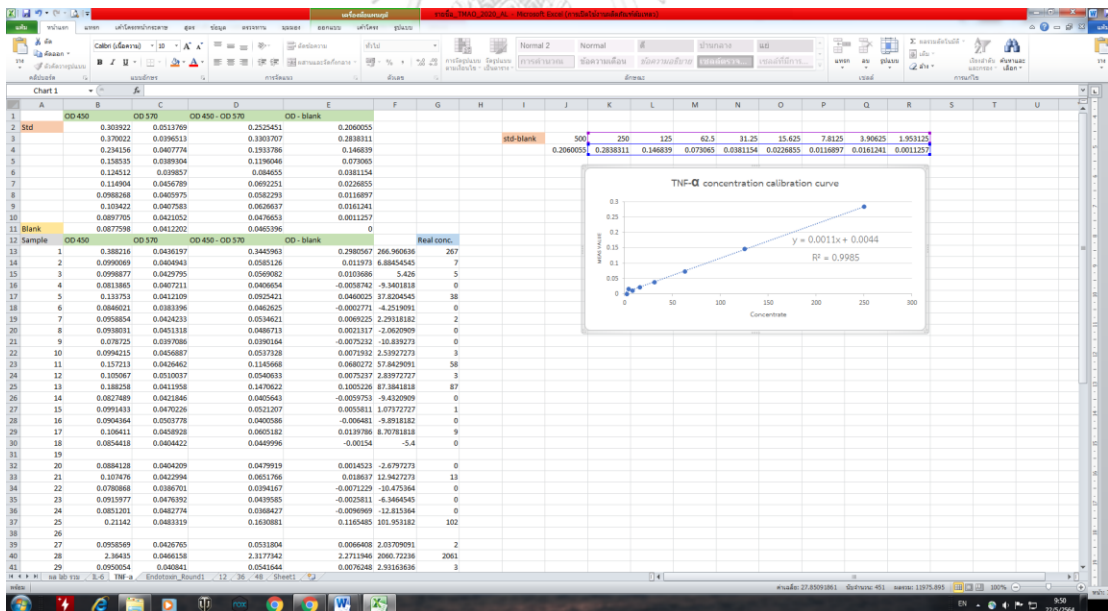
ภาพที่ 21 แสดงกราฟของสารมาตรฐาน IL-6 ด้วยหลักการ ELISA โดยที่สมการเชิงเส้น $y=0.0106x + 0.0231$, $R^2=0.9855$



ภาพที่ 22 แสดงกราฟของสารมาตรฐาน TNF- α ด้วยหลักการ ELISA โดยที่สมการเชิงเส้น $y=0.0011x + 0.0044$, $R^2=0.9985$



ภาพที่ 23 แสดงตัวอย่างการวิเคราะห์ serum IL-6 ด้วยหลักการ ELISA โดยใช้ฟังก์ชัน FORECAST ในโปรแกรม Microsoft excel ค่าการดูดกลืนของแสงจะแปรผันตรงกับปริมาณ serum IL-6 ในสิ่งส่งตรวจ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน



ภาพที่ 24 แสดงตัวอย่างการวิเคราะห์ serum TNF-α ด้วยหลักการ ELISA โดยใช้ฟังก์ชัน FORECAST ในโปรแกรม Microsoft excel ค่าการดูดกลืนของแสงจะแปรผันตรงกับปริมาณ serum TNF-α ในสิ่งส่งตรวจ โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

7. ผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่มีภาวะ endotoxemia

ข้อมูลลักษณะของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่มีภาวะ endotoxemia จำนวน 12 คน เป็นเพศชาย จำนวน 4 คน (33%) เพศหญิงจำนวน 8 คน (67%) นำมาเปรียบเทียบกับผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่ไม่มีภาวะ endotoxemia จำนวน 36 คน เป็นเพศชายจำนวน 18 คน (50%) เพศหญิงจำนวน 18 คน (50%) โดยคำนวณค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ดังต่อไปนี้ อายุเฉลี่ย 65 ± 13 เทียบกับ 64 ± 11 ปี ความสูง 160 ± 7 เทียบกับ 161 ± 10 เซนติเมตร และดัชนีมวลกาย (BMI) 23 ± 5 เทียบกับ 24 ± 5 ระยะเวลาการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียมของผู้ป่วยและน้ำหนักตัวหลังการฟอกเลือด คือ 12 ± 5 เทียบกับ 12 ± 5 ปี และ 58 ± 14 เทียบกับ 62 ± 16 กิโลกรัม และค่า laboratory (mean \pm SD) อื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 6 โดยพบค่า serum CRP ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่มีภาวะ endotoxemia (7.9 ± 10.7 มิลลิกรัม/ลิตร) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อเทียบกับผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่ไม่มีภาวะ endotoxemia (4.4 ± 9.7 มิลลิกรัม/ลิตร)

ตารางที่ 6 แสดงข้อมูลลักษณะของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่มีและไม่มีภาวะ endotoxemia

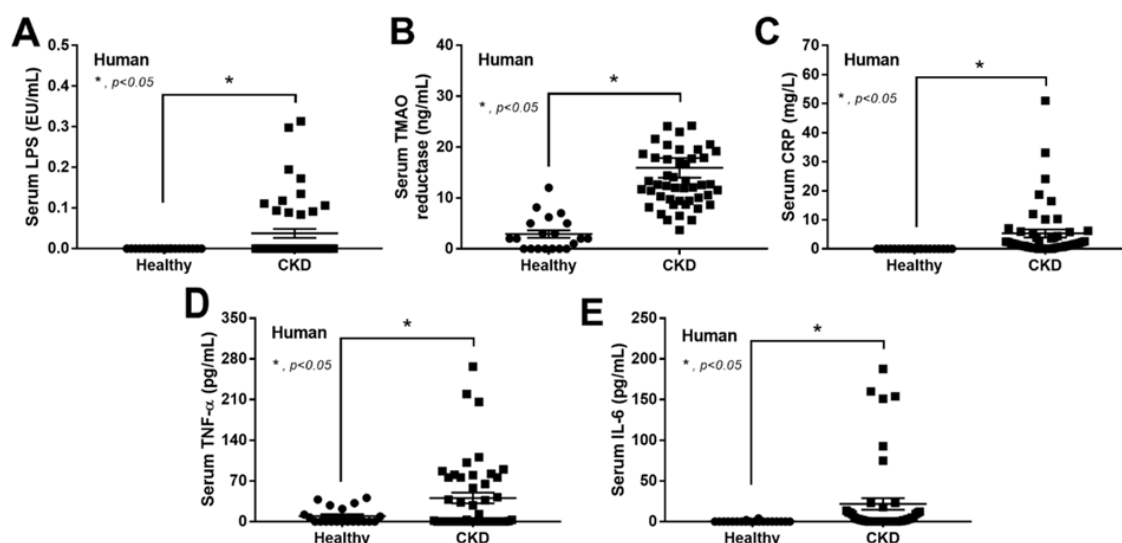
ค่าพารามิเตอร์ของกลุ่มตัวอย่าง	Endotoxemia (n=12)	Non- endotoxemia (n=36)	p value
อายุ (mean \pm SD) (ปี)	65.3 \pm 13.5	63.9 \pm 11.0	0.837
เพศ, จำนวน (%)			
ชาย	4 (33.33)	18 (50)	NS
หญิง	8 (66.67)	18 (50)	NS
น้ำหนักตัวหลังการฟอกเลือด (mean \pm SD) (กก.)	58.4 \pm 13.9	61.5 \pm 16.1	0.534
ส่วนสูง (mean \pm SD) (ซม.)	159.0 \pm 7.1	161.0 \pm 9.74	0.463
ดัชนีมวลกาย (mean \pm SD)	23.0 \pm 5.0	23.7 \pm 4.6	0.694
ระยะเวลาการฟอกเลือด (mean \pm SD) (ปี)	12.3 \pm 5.3	12.3 \pm 5.3	0.875
โรคไตขั้นต้น, จำนวน (%)			
เบาหวาน	4 (33.33)	20 (55.55)	NS
ความดันโลหิตสูง	4 (33.33)	4 (11.11)	NS
ไตอักเสบ	1 (8.33)	3 (8.33)	NS
ไม่ทราบสาเหตุ	3 (25)	9 (25)	NS

ค่าพารามิเตอร์ของกลุ่มตัวอย่าง	Endotoxemia (n=12)	Non- endotoxemia (n=36)	p value
ผลตรวจทางห้องปฏิบัติการ (mean ± SD)	103.8 ± 31.4	107.2 ± 27.3	0.438
Fasting plasma glucose (FBS) (mg/dL)	16.6 ± 7.5	19.9 ± 7.2	0.323
SGOT (U/L)	15.7 ± 10.3	18.1 ± 7.9	0.393
SGPT (U/L)	65.5 ± 25.5	67.7 ± 19.5	0.206
BUN (mg/dL)	8.3 ± 2.5	9.2 ± 2.9	0.670
Creatinine (mg/dL)	31,877 ± 8,985	28,963 ± 7,346	0.582
Beta-2 microglobulin (ug/L)	7.9 ± 10.7	4.4 ± 9.7	0.04*
Serum CRP (mg/L)	110.1 ± 140.3	16.4 ± 15.2	0.818
Serum TMAO (uM)	135.3 ± 162.2	16.4 ± 15.2	0.453
Serum TMAO reductase (ng/dL)	14.3 ± 5.1	153.77 ± 529.7	0.179
Serum TNF-alpha (pg/mL)	153.77 ± 26.3	24.2 ± 51.9	0.053
Serum IL-6 (pg/mL)	3.9 ± 4.3		

* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

NS หมายถึง แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

นำผลที่ได้จากการประเมินภาวะ endotoxemia ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง มาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี โดยใช้ค่า serum LPS เป็นตัวบ่งชี้การเกิดภาวะ endotoxemia และ serum TMAO reductase ซึ่งเป็นเอนไซม์ของแบคทีเรียในลำไส้ที่ปกติไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปในกระแสเลือดได้ นอกจากนี้ยังใช้ค่า serum CRP, serum TNF- α และ serum IL-6 เพื่อดูการตอบสนองต่อการอักเสบ โดยพบว่าในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ดังแสดงในภาพที่ 25

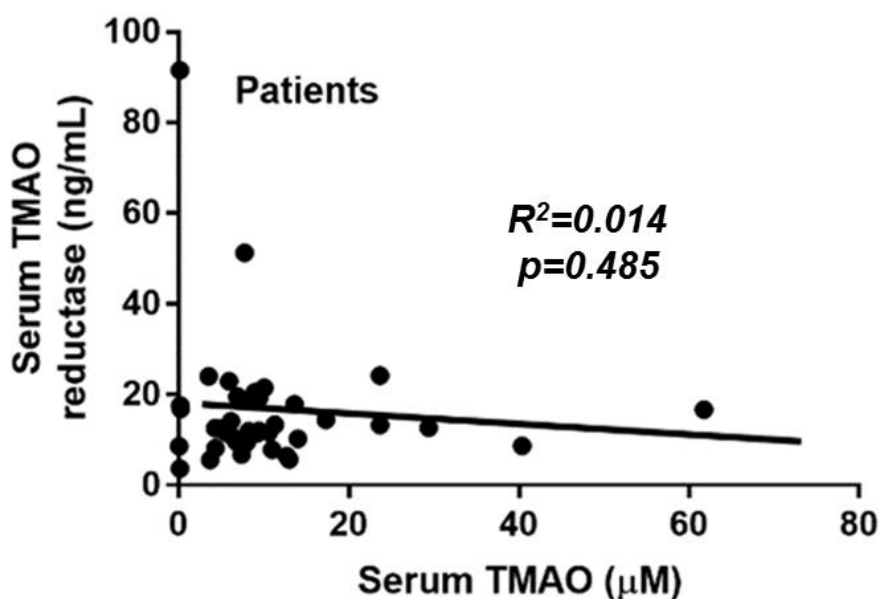


* หมายถึง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05

ภาพที่ 25 แสดงการเปรียบเทียบภาวะ gut leakage และการตอบสนองของกระบวนการอักเสบในเลือดระหว่างกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี ($n = 20$) และผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง ($n = 48$) ตามที่กำหนดโดย 1) gut leakage ได้แก่ serum LPS และ serum TMAO reductase (A-B) 2) การตอบสนองต่อการอักเสบโดยแสดงให้เห็นถึง serum CRP, serum TNF- α และ serum IL-6 (C-E)

8. ความสัมพันธ์ระหว่าง serum TMAO และ serum TMAO reductase

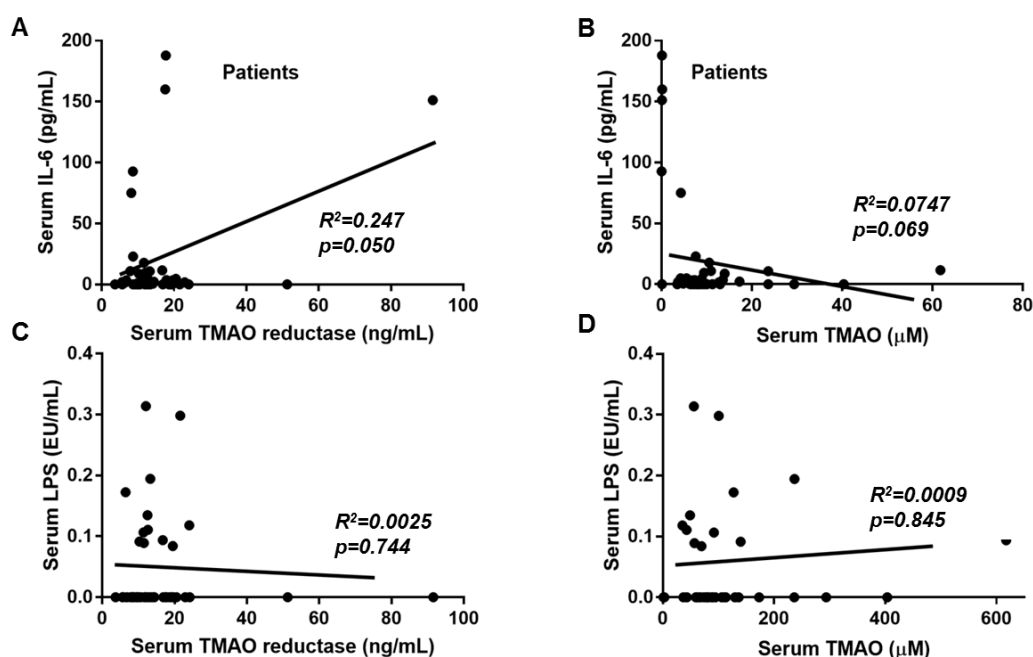
นำค่า serum TMAO และ serum TMAO reductase ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง ที่ได้จากการวิเคราะห์หาความสัมพันธ์ในการวิเคราะห์ความถดถอย จะเป็นการประมาณความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระ x (serum TMAO) ต่อตัวแปรตาม y (serum TMAO reductase) โดยทำการสร้างสมการความถดถอยเพื่อใช้ในการทำนายตัวแปรตาม ซึ่งในการตรวจสอบว่าสมการความถดถอยนั้นสามารถอธิบายความสัมพันธ์ได้ดีหรือไม่ โดยส่วนใหญ่แล้วจะดูจากสัมประสิทธิ์การตัดสินใจ (coefficient of determination: R square; R^2) ซึ่งในที่นี้ R^2 ของ serum TMAO กับ serum TMAO reductase มีค่าเท่ากับ 0.0114, $p=0.485$ ดังแสดงในภาพที่ 26



ภาพที่ 26 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่าง serum TMAO กับ serum TMAO reductase ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง (n = 48) โดยค่าการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์การตัดสิ้นใจ $R^2=0.014$, $p=0.485$

9. ความสัมพันธ์ระหว่าง serum TMAO, serum TMAO reductase กับการตอบสนองของกระบวนการอักเสบและ serum LPS

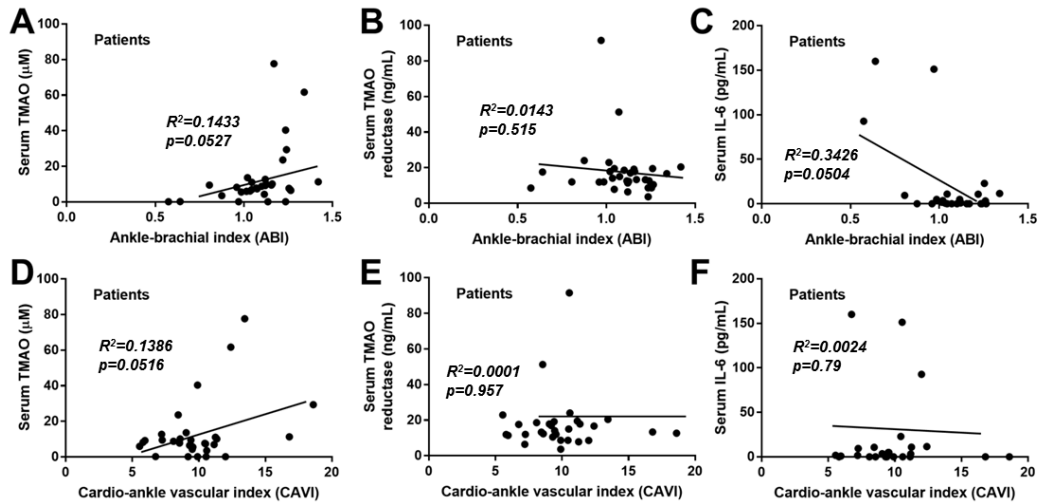
นำค่า serum TMAO และ serum TMAO reductase ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง ที่ได้จากการวิเคราะห์มาหาความสัมพันธ์กับการตอบสนองของกระบวนการอักเสบ (serum IL-6) และ serum LPS (ตัวบ่งชี้การเกิดภาวะ endotoxemia) เพื่อดูทิศทางความสัมพันธ์ว่าอยู่ในระดับใดโดยดูจากสัมประสิทธิ์การตัดสิ้นใจ R^2 ซึ่งในที่นี้ R^2 ของ serum TMAO reductase กับ serum IL-6 และ serum LPS มีค่าเท่ากับ 0.247 และ 0.0025 ตามลำดับ และ R^2 ของ serum TMAO กับ serum IL-6 และ serum LPS มีค่าเท่ากับ 0.0747 และ 0.0009 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 27



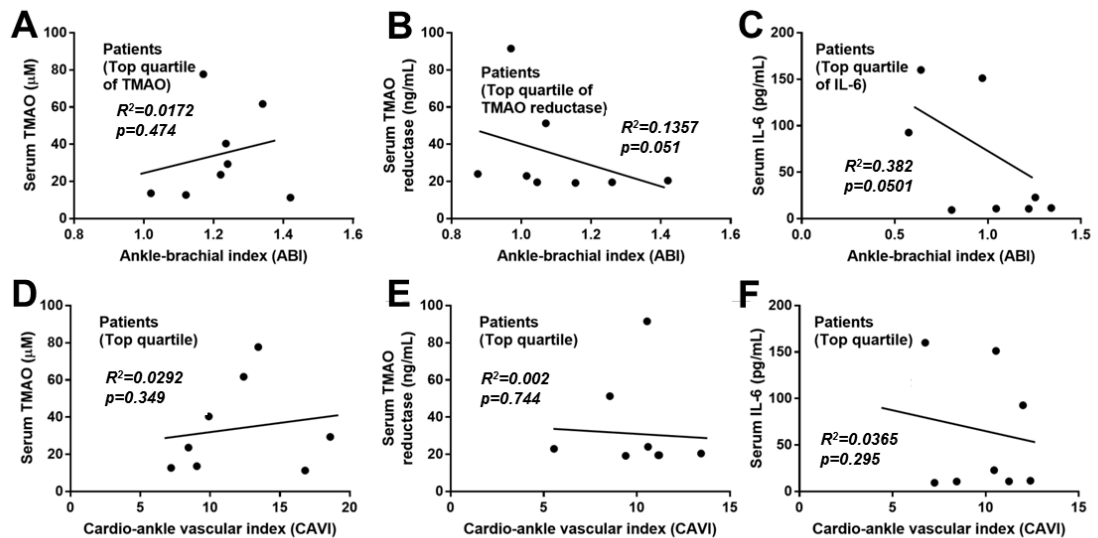
ภาพที่ 27 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่าง serum TMAO reductase หรือ serum TMAO กับการตอบสนองของการอักเสบ (serum IL-6) $R^2=0.247$, $p=0.050$ และ $R^2=0.0747$, $p=0.069$ ตามลำดับ (A, B) และ endotoxemia $R^2=0.0025$, $p=0.744$ และ $R^2=0.0009$, $p=0.845$ ตามลำดับ (C, D) ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง ($n = 48$)

10. ความสัมพันธ์ระหว่างภาวะหลอดเลือดแข็งตัวกับ serum TMAO, serum TMAO reductase และ serum IL-6

โดยใช้ดัชนีข้อเท้า - ข้อเท้า (ankle-brachial index; ABI) และดัชนีหลอดเลือดหัวใจ - ข้อเท้า (cardio-ankle vascular index; CAVI) เป็นตัวบ่งชี้ของโรคหลอดเลือดและความตึงของหลอดเลือดตามลำดับที่ใช้วัดในผู้ป่วย นำมาหาความสัมพันธ์กับ serum TMAO, serum TMAO reductase และ serum IL-6 เพื่อจะนำไปเป็นตัวบ่งชี้ภาวะหลอดเลือดแข็งตัวในอนาคต โดยพบค่า R^2 ของ serum TMAO กับ ABI และ CAVI มีค่าเท่ากับ 0.1433 และ 0.1386 ตามลำดับ ค่า R^2 ของ serum TMAO reductase กับ ABI และ CAVI มีค่าเท่ากับ 0.0143 และ 0.0001 ตามลำดับ และค่า R^2 ของ serum IL-6 มีค่าเชิงลบกับ ABI และ CAVI เท่ากับ 0.3426 และ 0.0024 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 28 เนื่องด้วยค่าที่ได้ มีค่า R^2 ที่ไม่แสดงถึงความสัมพันธ์ที่ดีจึงได้นำค่าคอวโวลส์สูงสุดของ serum TMAO, serum TMAO reductase และ serum IL-6 เทียบกับ ABI หรือ CAVI จำนวน 8 ตัวอย่าง ดังแสดงในภาพที่ 29



ภาพที่ 28 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่าง serum TMAO, serum TMAO reductase หรือ serum IL-6 เทียบกับภาวะหลอดเลือดแข็งตัว โดยใช้ดัชนีหลอดเลือดข้อเท้าถึงข้อเท้า (ABI) $R^2=0.1443, 0.0143, 0.3426$ ตามลำดับ (A-C) และดัชนีหลอดเลือดข้อเท้าถึงหัวใจ (CAVI) $R^2=0.1386, 0.0001, 0.0024$ ตามลำดับ (D-F) ($n = 32$)



ภาพที่ 29 แสดงค่าความสัมพันธ์ระหว่างค่าควอไทล์สูงสุดของ serum TMAO, serum TMAO reductase และ serum IL-6 เทียบกับภาวะหลอดเลือดแข็งตัว โดยใช้ดัชนีหลอดเลือดข้อเท้าถึงข้อเท้า (ABI) $R^2=0.0172, 0.1357, 0.382$ ตามลำดับ (A-C) และดัชนีหลอดเลือดข้อเท้าถึงหัวใจ (CAVI) $R^2=0.0292, 0.002, 0.365$ ตามลำดับ (D-F) ($n = 8$)

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

1. กลุ่มตัวอย่างและข้อมูลผู้ป่วย

การศึกษาวินิจฉัยนี้เป็นการศึกษาวินิจฉัยนำร่อง (pilot study) ที่ทำตามความเหมาะสมของงบประมาณ จากการวิเคราะห์ข้อมูลของกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี จำนวน 20 คน และกลุ่มผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง จำนวน 48 คน เพื่อหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สามารถนำมาใช้เป็นกลุ่มควบคุมได้ โดยผู้ป่วยที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นผู้ป่วยโรคไตระยะสุดท้าย (มีค่า eGFR น้อยกว่า 15 มิลลิลิตรต่อนาทีต่อ 1.73 ตารางเมตร) ได้รับการฟอกเลือดด้วยเครื่องไตเทียม (hemodialysis) อย่างต่อเนื่องเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 5 ปี อายุ 40 ปีขึ้นไป เป็นเพศชายจำนวน 22 คน คิดเป็น 46% ไม่เคยมีอาการแทรกซ้อนของภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดมาก่อน และโรคประจำตัวของผู้ป่วยส่วนใหญ่เป็นโรคไตจากเบาหวาน (50%) สอดคล้องกับรายงานผู้ป่วยประจำปีของสมาคมโรคไตแห่งประเทศไทย (28,29) รองลงมาคือความดันโลหิตสูง (17%) และโรคไตอักเสบ (8%) ตามลำดับ ส่วนที่ไม่ทราบสาเหตุ (25%) ยังไม่สามารถวินิจฉัยได้ ซึ่งเป็นผู้ป่วยของโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ สภากาชาดไทย และกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีจำนวน 20 คน ซึ่งมีค่า eGFR มากกว่า 90 มิลลิลิตรต่อนาทีต่อ 1.73 ตารางเมตร มีค่าการทำงานของตับ (SGOT, SGPT) และค่าการทำงานของไต (BUN, creatinine) อยู่ในเกณฑ์ปกติ อายุ 40 ปีขึ้นไป เป็นเพศชายจำนวน 8 คน คิดเป็น 40% และเมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังและกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี โดยวัดค่าการทำงานของตับ (SGOT และ SGPT) พบว่าค่าของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่ได้อยู่ในช่วงปกติ (<40 ยูนิท/ลิตร) แต่เมื่อนำค่าเฉลี่ยมาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี พบว่าในผู้ป่วยมีค่าการทำงานของตับสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 แสดงให้เห็นว่าในกลุ่มผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่ใช้ในการวิจัยนี้ไม่ได้เป็นโรคตับแต่อย่างใดจึงเป็นกลุ่มตัวอย่างที่ดีที่จะใช้ในการศึกษา แต่ค่าเฉลี่ยของการทำงานของตับที่สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี นั้นเกิดจาก SGOT และ SGPT ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ตรวจพบได้ในกระแสเลือด ซึ่งจะสร้างขึ้นมาจากตับ เม็ดเลือดแดง หัวใจ กล้ามเนื้อ ตับอ่อน รวมถึงไตด้วย (3) เมื่อไตเกิดความเสียหาย จึงทำให้มีค่าเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี

นอกจากนี้ในส่วนของการวิเคราะห์สารพิษทั้งหมดของภาวะ uremia toxin ได้แก่ สารที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก คือ BUN และ creatinine สารที่มีโมเลกุลขนาดกลาง คือ B2M โดยพบว่าในผู้ป่วย

โรคไตเรื้อรังมีค่า BUN, creatinine และ B2M สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.01 สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้า (72-75) เป็นการตรวจยืนยันว่ากลุ่มตัวอย่างควบคุมที่มีสุขภาพดีนี้ ไม่เกี่ยวข้องกับโรคไตและสามารถนำมาใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ โดยค่า uremia toxin ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง มีค่าสูงกว่าอย่างชัดเจน

2. การวิเคราะห์ serum TMAO

การวิเคราะห์ serum TMAO ในครั้งนี้เป็นครั้งแรกในประเทศไทยโดยยังไม่ปรากฏหลักฐานว่ามีที่ไหนเคยทำมาก่อน เนื่องจากมีขั้นตอนที่ยุ่งยากซับซ้อน ราคาแพงและต้องใช้เครื่องมือจำเพาะ ได้แก่ เครื่อง mass spectrometer ซึ่งจะมีเฉพาะบางห้องปฏิบัติการขนาดใหญ่เท่านั้น โดยการวิเคราะห์ในครั้งนี้ได้รับความช่วยเหลือจาก ศูนย์ห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยได้แสดงให้เห็นความน่าเชื่อถือของการวิเคราะห์ในครั้งนี้ ซึ่งแสดงได้จากความเข้มข้นของ serum TMAO เป็นที่ยอมรับได้เมื่อความถูกต้องของค่าที่กำหนดจากตัวอย่างควบคุมอยู่ภายใน $100 \pm 10\%$ โดยในขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างนั้นมีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากสาร TMAO นี้มีปริมาณน้อยมาก และใช้ปริมาณตัวอย่างที่นำมาสกัดเพียง 20 ไมโครลิตรเท่านั้น จึงต้องอาศัยผู้ที่มีความชำนาญ และเครื่องมือที่มีความถูกต้องแม่นยำ รวมถึงน้ำยาที่ใช้ต้องเป็นเกรด mass spectrometry เท่านั้น จึงจะได้มาซึ่งความถูกต้องแม่นยำ และเมื่อนำค่า serum TMAO ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง ($n = 48$) คำนวนค่าเฉลี่ย (μM) \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ได้ 117 ± 114 มาทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี ($n = 20$) คำนวนค่าเฉลี่ย (μM) \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ได้ 24.97 ± 37.94 พบว่ามีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tang WH. และคณะ (59) ที่ได้ตรวจสอบค่าการพยากรณ์โรคทางคลินิกของ TMAO ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง และทดสอบสมมติฐานที่ว่า TMAO มีส่วนร่วมโดยตรงที่ทำให้เกิดความผิดปกติของไต และได้สรุปไว้ว่า ระดับ TMAO ในพลาสมาจะสูงขึ้นในผู้ป่วยที่เป็นโรคไตเรื้อรัง รวมถึงอัตราการดำรงชีวิตอยู่ในระยะยาวของผู้ป่วยที่เป็นโรคไตเรื้อรังนั้นน้อยลงด้วย เนื่องมาจากแบคทีเรียบางชนิดที่อยู่ในทางเดินอาหารใช้คาร์นิทีนเป็นแหล่งพลังงาน สามารถย่อยสลายคาร์นิทีนและเกิดเป็นของเสียที่ชื่อ trimethylamine (TMA) ซึ่งระดับของคนจะเปลี่ยนแปลงสาร TMA นี้ให้กลายเป็น TMAO แล้วกรองผ่านไต (8) ดังนั้นเมื่อไตเกิดการเสื่อมจึงสูญเสียหน้าที่ในการขับสารนี้ออกไปด้วย และในงานวิจัยของ Guangping S. และคณะ (9) ที่ได้ทดลองป้อนสารคาร์นิทีน ซึ่งเป็นสารที่มีมากในเนื้อแดงและเครื่องดื่มบำรุงกำลัง จะทำให้เส้นเลือดแดงหนาและแข็งตัวขึ้นเพิ่มความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ ในเมื่อค่า serum TMAO ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังสูงกว่าปกติก็น่าจะส่งผลให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็งตัวได้เช่นกัน

3. การวิเคราะห์ความแข็งตัวของหลอดเลือดด้วยหลักการ ABI และ CAVI

ผลการวิเคราะห์ค่าความแข็งตัวของหลอดเลือดของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง (n=32) ด้วยหลักการ ABI และ CAVI ผ่านเครื่องตรวจ VaSera รุ่น VS-2000 (Fukuda denshi, ญี่ปุ่น) โดยทำการวัดความยืดหยุ่นของเส้นเลือดในขณะที่ผู้ป่วยนอนราบ หายใจปกติและไม่มีอาการตื่นเต้นหรือเหนื่อยหอบแต่อย่างใด ส่วนผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่ไม่สามารถทำการตรวจวัดได้เนื่องจากผู้ป่วยมีการเสียชีวิตระหว่างการทำวิจัยและผู้ป่วยที่ไม่พร้อมในการตรวจวัด แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อนำค่าที่ได้มาคำนวณค่าเฉลี่ย \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ได้แก่ค่า ABI ได้ 1.01 ± 0.23 โดยค่าปกติของ ABI จะประมาณ 1.0-1.1 ค่าผิดปกติก็ต่อเมื่อ ABI น้อยกว่า 0.9 จะบ่งชี้ว่ามีการอุดตันในหลอดเลือดแดงที่ขา ณ ตำแหน่งใดตำแหน่งหนึ่ง ซึ่งค่ายิ่งน้อยก็ยิ่งบ่งบอกว่ามีการอุดตันในหลอดเลือดสูงมากขึ้นเท่านั้น และ ค่า CAVI ได้ 9.04 ± 2.48 ถ้าค่า CAVI < 8 แสดงว่าหลอดเลือดแดงปกติ ค่า CAVI ระหว่าง 8-9 แสดงว่าผู้ป่วยมีภาวะเสี่ยงต่อการเกิดหลอดเลือดแดงแข็ง และถ้าค่า CAVI ≥ 9 แสดงว่ามีภาวะหลอดเลือดแดงแข็ง (35,36) แสดงให้เห็นว่าค่าเฉลี่ย CAVI ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีภาวะเสี่ยงต่อการเกิดหลอดเลือดแดงแข็ง สอดคล้องกับงานวิจัยของ Shafi T. และคณะ (72) ที่ได้แสดงให้เห็นว่า TMAO มีความสัมพันธ์กับโรคของหลอดเลือดหัวใจและการเสียชีวิตในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง และได้เสนอให้มีการทดลองทางคลินิกที่ได้ออกแบบมาอย่างรอบคอบเพื่อตรวจสอบผลลัพธ์ของการลดความเข้มข้นของระดับ TMAO ในเลือดของผู้ป่วยล้างไต (dialysis patients) ด้วย ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้จะนำค่า ABI และ CAVI ที่ได้ไปหาความสัมพันธ์กับค่า TMAO, TMAO reductase และการตอบสนองต่อการอักเสบ (IL-6) ต่อไป

4. การวิเคราะห์ serum TMAO reductase

การวิเคราะห์ serum TMAO reductase ในครั้งนี้ใช้หลักการ ELISA แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 นาโนเมตร ซึ่งค่าการดูดกลืนของแสงจะแปรผันตรงกับปริมาณ serum TMAO reductase ในสิ่งส่งตรวจ โดยเทียบกับกราฟของสารมาตรฐาน (standard curve) โดยค่า serum TMAO reductase ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังที่ได้มีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 15.93 ± 13.44 นำไปเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี พบว่ามีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีความเป็นไปได้ที่จะเกิดภาวะ endotoxemia จากการเคลื่อนย้ายของโมเลกุลผ่าน gut leakage (56) ดังนั้นสารพิษในกระแสเลือด จึงเป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งของความเสียหายของ tight junction ในลำไส้ (57) ซึ่งเป็นสาเหตุของ gut leakage ที่เกิดจาก uremia และเป็นที่ยอมรับกันว่า trimethylamine N-oxide (TMAO) ที่ได้จากแบคทีเรียในทางเดินอาหารที่ย่อยสลาย phosphatidylcholine และคาร์นิทีนในอาหารไปเป็น TMA หลังจากนั้นเอนไซม์ flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3) จากตับจะเปลี่ยน TMA ไปเป็น TMAO ซึ่ง phosphatidylcholine หรือ lecithin สาร TMA ที่เกิดขึ้นจากการเมตาโบไลต์ที่ได้จากทางเดินอาหารของฟอสฟาติดีลโคลีน

คือเอมีนออกไซด์ที่มีขนาดเล็กพอสำหรับการขนส่งแบบพาสซีฟผ่าน TJ และเปลี่ยนเป็นสารพิษในกระแสเลือด (58) ซึ่งทำให้การทำงานของไตเสื่อมคุณภาพ (59) นอกจากนี้แบคทีเรียในลำไส้ยังสามารถผลิต TMAO reductase (MW ที่ 172 kDa) ซึ่งเป็นเอนไซม์ของแบคทีเรียที่ใช้เผาผลาญ TMAO (60, 61) โดยปกติจะไม่สามารถเคลื่อนย้ายผ่านลำไส้ในคนที่มีสุขภาพดี (47) ดังนั้นการตรวจหา TMAO reductase ในเลือดอาจเกี่ยวข้องกับ gut leakage แตกต่างจากข้อจำกัดของ endotoxemia ในฐานะ biomarker สำหรับ gut leakage ซึ่งอาจเกิดการปนเปื้อน LPS ในระหว่างการฟอกเลือด การตรวจหา TMAO reductase ในซีรัมอาจมีความเฉพาะเจาะจงมากขึ้นสำหรับ gut leakage และเนื่องจาก TMAO เกี่ยวข้องกับภาวะแทรกซ้อนทางหลอดเลือดในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง (62-68) ดังนั้น TMAO reductase อาจเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสำหรับภาวะแทรกซ้อนของหลอดเลือดของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังได้ ซึ่งมีวิธีการที่ง่ายกว่าในการตรวจ serum TMAO reductase (โดยใช้ ELISA) เมื่อเทียบกับการตรวจ serum TMAO (โดยใช้ mass spectrometry) ในห้องปฏิบัติการทางคลินิกทั่วไป

5. การตรวจวิเคราะห์ serum LPS

การวิเคราะห์ serum LPS ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง ได้ค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 0.113 ± 0.294 นาโนกรัมเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี พบว่ามีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 แสดงให้เห็นว่า serum LPS และ serum TMAO reductase นั้นสามารถเคลื่อนย้ายโมเลกุลผ่าน gut leakage ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wang F. และคณะ (56) ที่ได้ศึกษาภาวะ endotoxemia ในหนูทดลองที่ทำให้เกิดโรคไตเรื้อรัง ทำให้แบคทีเรียสามารถเคลื่อนย้ายไปสู่การไหลเวียนของกระแสเลือดและมีส่วนทำให้เกิดการอักเสบขึ้นในหนูทดลองที่มีภาวะ uremia โดยที่ LPS นี้เป็น endotoxin ที่พบเฉพาะในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น ชั้นนอกสุดของผนังเซลล์หรือ outer envelope หรือ outer membrane มีโครงสร้างเหมือนกับเมมเบรนอื่น ๆ ที่พบทั่วไป โดยมีโครงสร้างที่ซับซ้อนมากและประกอบด้วยแอนติเจนที่เหนี่ยวนำการสร้างแอนติบอดีในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และความเป็นพิษของแบคทีเรียแกรมลบอาจทำให้เกิดอาการไข้ ซ็อก และอาการอื่น ๆ (71)

6. การตรวจวิเคราะห์ serum cytokine (serum IL-6, serum TNF- α)

การสะสมของ oxidized LDL จะกระตุ้นให้เม็ดเลือดขาวชนิดแมคโครเฟจพัฒนาและเคลื่อนที่เข้ามาจับกิน LDL ได้โดยไม่จำกัดจำนวน กลายเป็นเซลล์ที่มีไขมันสะสมอยู่เต็มเซลล์เรียกว่า โฟมเซลล์เม็ดเลือดขาวเหล่านี้เป็นตัวกระตุ้นให้มีการสร้าง ROS เพิ่มขึ้น ซึ่งยิ่งทำให้มี oxidized LDL มากขึ้น โดยในงานวิจัยก่อนหน้าพบว่า TMAO ทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ oxidized LDL และเกิดโฟม

เซลล์มากขึ้น (40) โฟมเซลล์และไขมันจากเซลล์ที่แตกจะสะสมรวมกลุ่มในผนังหลอดเลือด และมีกระบวนการอักเสบตามมา เกิดการสร้างเส้นใยเพื่อการสมานต่าง ๆ จนเกิดเป็นคราบไขมันทับถมที่เรียกว่า plaque ทำให้รูหลอดเลือดแคบลง และเกิดหลอดเลือดตีบตามมาได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งหาก plaque นั้นแตกออกและเกิดการกระตุ้นการสร้างลิ่มเลือด และเนื่องจากในกลุ่มผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีค่า serum TMAO สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษา proinflammation cytokine (serum IL-6, serum TNF- α) ในกลุ่มผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังเพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี เพื่อเป็นการยืนยันว่ามีการกระตุ้นแมคโครเฟจ และเกิดการอักเสบตามทฤษฎีที่ได้กล่าวไว้ โดยค่า serum IL-6 และ serum TNF- α ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีค่าเฉลี่ย (pg/mL) \pm ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) 18.54 ± 44.92 และ 114.63 ± 452.43 ตามลำดับ และพบว่าในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีค่า serum IL-6 และ serum TNF- α สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 แสดงให้เห็นว่ามีการกระตุ้นกระบวนการอักเสบในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังและอาจเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะหลอดเลือดแดงแข็งได้

7. ความสัมพันธ์ระหว่าง serum TMAO และ serum TMAO reductase

การศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่าง serum TMAO และ serum TMAO reductase นั้น ยังไม่มีปรากฏเป็นหลักฐานมาก่อน การศึกษาครั้งนี้เป็นครั้งแรก โดยนำค่า serum TMAO และ serum TMAO reductase ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง ที่ได้จากการวิเคราะห์มาหาความสัมพันธ์ในการวิเคราะห์ความถดถอย เป็นการประมาณความสัมพันธ์ของตัวแปรอิสระ x (serum TMAO) ต่อตัวแปรตาม y (serum TMAO reductase) โดยทำการสร้างสมการความถดถอยเพื่อใช้ในการทำนายตัวแปรตาม พบว่าค่าการวิเคราะห์สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ $R^2=0.0114$, $p=0.485$ หมายความว่าความสัมพันธ์ระหว่าง serum TMAO และ serum TMAO reductase มีความสัมพันธ์กันเพียงเล็กน้อยเท่านั้นและไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งไม่เป็นไปตามที่คาดไว้ อาจเนื่องมาจากจำนวนตัวอย่าง ($n=48$) นั้นยังไม่เพียงพอที่จะทำให้เกิดความสัมพันธ์ที่ดีได้ หรือมีสารพิษหลายตัวในกระแสเลือด (uremia toxin) ที่เป็นสาเหตุสำคัญอย่างหนึ่งของความเสียหายของ tight junction ในลำไส้ (57) และทำให้เกิด gut leakage ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง หรือชนิดและปริมาณของแบคทีเรียในลำไส้ที่มีส่วนในการผลิต TMAO reductase ที่แตกต่างกันในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง อย่างไรก็ตามทั้ง serum TMAO และ serum TMAO reductase ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 การศึกษาเพิ่มเติมในจำนวนผู้ป่วยนี้เป็นสิ่งที่น่าสนใจ

8. ความสัมพันธ์ระหว่าง serum TMAO, serum TMAO reductase กับการตอบสนองของ กระบวนการอักเสบในผู้ป่วยที่มีภาวะ endotoxemia

นำค่า serum TMAO และ serum TMAO reductase ของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง ที่ได้จากการ วิเคราะห์มาหาความสัมพันธ์กับการตอบสนองของกระบวนการอักเสบ (serum IL-6) และ serum LPS ตัวบ่งชี้การเกิดภาวะ endotoxemia เพื่อดูทิศทางความสัมพันธ์ว่าอยู่ในระดับใดโดยดูจาก สัมประสิทธิ์การตัดสินใจ R^2 ซึ่งในการวิเคราะห์ R^2 ของ serum TMAO reductase กับ serum IL-6 และ serum LPS มีค่าเท่ากับ 0.247 และ 0.0025 ตามลำดับ และ R^2 ของ serum TMAO กับ serum IL-6 และ serum LPS มีค่าเท่ากับ 0.0747 และ 0.0009 ตามลำดับ โดยเฉพาะความสัมพันธ์ ของ serum TMAO กับ serum IL-6 ที่มีลักษณะเชิงลบ แสดงให้เห็นถึงข้อจำกัดของ serum TMAO และ serum TMAO reductase ในทางคลินิก แม้จะมี serum TMAO reductase เพิ่มขึ้นในผู้ป่วย โรคไตเรื้อรัง เมื่อพิจารณาถึงภาวะ endotoxemia (ในผู้ป่วย 12 รายจาก 48 ราย) และไซโตไคน์สูง กว่ากลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีสอดคล้องกับงานวิจัยที่เคยมีมา (72-75) เนื่องจากผู้ป่วยไม่มีการติดเชื้อ มาก่อน และ endotoxemia ที่พบในผู้ป่วยเหล่านี้ไม่ได้มีการปนเปื้อนจากการฟอกเลือดด้วยเครื่องไต เทียม แต่น่าจะเป็นความบกพร่องในการซึมผ่านของลำไส้ นอกจากนี้ยังพบว่า serum CRP (7.9 ± 10.7 มิลลิกรัม/ลิตร เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากค่าปกติ <5 มิลลิกรัม/ลิตร) ในผู้ป่วยที่มีภาวะ endotoxemia แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ 0.05 เมื่อเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่มีภาวะ endotoxemia แม้ว่าจะไม่มีการเพิ่มขึ้นของไซโตไคน์ในซีรัมก็ตาม ดังแสดงในตารางที่ 6 แสดงให้ เห็นว่า serum CRP ที่ถูกสร้างขึ้นเมื่อร่างกายมีภาวะอักเสบ หรือการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ จะเพิ่มขึ้น อย่างรวดเร็วภายใน 6-10 ชั่วโมง และขึ้นสูงสุดใน 24-72 ชั่วโมง และลดลงสู่ระดับปกติใน 1-2 สัปดาห์ การตรวจ serum CRP มีข้อดีว่าการตรวจไซโตไคน์ในซีรัมที่อาจจะลดลงสู่ระดับปกติเร็ว กว่า แพทย์จึงนิยมใช้ serum CRP เพื่อประเมินภาวะอักเสบของร่างกาย อย่างไรก็ตาม LPS ในซีรัม ไม่สามารถตรวจพบได้ในการวัดซ้ำใน 1 สัปดาห์ต่อมาในผู้ป่วยเหล่านี้ทั้งหมด ซึ่งบ่งบอกถึงภาวะการ เกิด endotoxemia ชั่วคราวซึ่งอาจจะเกิดจากอาหารหรือปัจจัยอื่น ๆ การศึกษาเพิ่มเติมเป็นเรื่องที่ น่าสนใจอย่างยิ่ง

9. ความไม่สัมพันธ์ระหว่างภาวะหลอดเลือดแข็งตัวกับ serum TMAO, serum TMAO reductase และ serum IL-6

การหาความสัมพันธ์ระหว่างภาวะหลอดเลือดแข็งตัวกับ serum TMAO, serum TMAO reductase และ serum IL-6 โดยใช้ดัชนีข้อเท้า-ข้อเท้า (ankle-brachial index; ABI) และดัชนี หลอดเลือดหัวใจ-ข้อเท้า (cardio-ankle vascular index; CAVI) เป็นตัวบ่งชี้ภาวะหลอดเลือดแข็งตัว โดยพบค่า R^2 ของ serum TMAO กับ ABI และ CAVI มีค่าเท่ากับ 0.1433 และ 0.1386 ตามลำดับ

ค่า R^2 ของ serum TMAO reductase กับ ABI และ CAVI มีค่าเท่ากับ 0.0143 และ 0.0001 ตามลำดับ และค่า R^2 ของ serum IL-6 มีค่าเชิงลบกับ ABI และ CAVI เท่ากับ 0.3426 และ 0.0024 ตามลำดับ แสดงให้เห็นถึงความไม่สัมพันธ์ระหว่างภาวะหลอดเลือดแข็งตัวกับ serum TMAO, serum TMAO reductase และ serum IL-6 โดยเฉพาะอย่างยิ่งความไม่สัมพันธ์ระหว่าง serum TMAO กับภาวะหลอดเลือดแข็งตัว (ABI และ CAVI) ที่แตกต่างจากงานวิจัยก่อนหน้า (62-64) และเนื่องด้วยค่าที่ได้ มีค่า R^2 ที่ไม่แสดงถึงความสัมพันธ์ที่ดีจึงได้นำค่าควอไทล์สูงสุดของ serum TMAO, serum TMAO reductase และ serum IL-6 เทียบกับ ABI หรือ CAVI จำนวน 8 ตัวอย่าง แต่ยังไม่พบความสัมพันธ์ที่ดีขึ้น ดังนั้นประโยชน์ของ serum TMAO และ serum TMAO reductase ที่จะนำมาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarkers) เพื่อประเมินภาวะหลอดเลือดแดงแข็งตัวของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังนั้นยังมีข้อจำกัด ด้วยเหตุที่ว่าผลการทดสอบไม่ไปในทิศทางเดียวกันในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง อาจเนื่องมาจากข้อจำกัดจากปัจจัยทางคลินิกหลายประการ เช่น การใช้ยา โรคประจำตัวและการฟอกเลือด และอาจเป็นเพราะข้อจำกัดในจำนวนผู้ป่วยในการศึกษานำร่องของเรา จำเป็นต้องมีการศึกษาผู้ป่วยที่เป็นโรคไตวายเรื้อรังระยะสุดท้าย (ESRD) ในจำนวนที่เหมาะสมก่อนการฟอกเลือดด้วยและการตรวจวัด gut leakage โดยตรงต่อไป

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

TMAO และ TMAO reductase ในซีรัมของผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง ไม่มีความสัมพันธ์กับภาวะหลอดเลือดแข็งตัว ดังนั้น serum TMAO reductase ที่จะนำมาพิจารณาเป็นตัวบ่งชี้เพื่อประเมินภาวะหลอดเลือดแข็งตัว ยังไม่สามารถทำได้ในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง อีกทั้งยังไม่มีความสัมพันธ์กับ serum TMAO และ endotoxemia (ตัวบ่งชี้ของ gut leakage) มีเพียงความสัมพันธ์เล็กน้อยกับระบบการอักเสบเท่านั้น แม้ว่าระดับ serum TMAO reductase จะเพิ่มขึ้นในผู้ป่วยโรคไตเรื้อรัง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่มีสุขภาพดีก็ตาม แสดงให้เห็นข้อจำกัดของ serum TMAO reductase ในการพอกเลือดของผู้ป่วย การศึกษาเพิ่มเติมในผู้ป่วย ESRD ก่อนการพอกเลือดเป็นสิ่งที่น่าสนใจ

อย่างไรก็ตาม ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษาในงานวิจัยนี้ คือการได้เรียนรู้วิธีการตรวจวิเคราะห์โปรตีโอมิกส์ (proteomics) ซึ่งเป็นวิทยาศาสตร์แขนงหนึ่งที่ศึกษาโปรตีนในสิ่งมีชีวิต ด้วยหลักการ mass spectrometry ที่มีความไวในการตรวจวัด (sensitivity) สูงมาก ทำให้สามารถวิเคราะห์หาปริมาณสารตัวอย่างที่อยู่ในระดับต่ำมากได้อย่างถูกต้องแม่นยำ และจะนำความรู้และเทคโนโลยีทางด้านโปรตีโอมิกส์นี้ ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาถึงชีววิทยาและสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิต เพื่อที่จะก่อให้เกิดความรู้ความเข้าใจในโรคต่าง ๆ ของมนุษย์ได้ดียิ่งขึ้นต่อไปในอนาคต

บรรณานุกรม

1. Ingsathit A, Thakkestian A, Chaiprasert A, Sangthawan P, Gojaseni P, Kiattisunthorn K. Prevalence and risk factors of chronic kidney disease in the Thai adult population: Thai seek study. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25(5):1567-75. 2010.
2. Nathan H, Samuel Fa, Jason O, Jennifer H, Christopher O, Daniel L, Richard H. Global prevalence of chronic kidney disease - A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE*. 2016;11(7):e0158765.
3. Bembien N, Pherson M, Dipiro J, Talbert R, Yee G, Matzke G, Wells B, Posey L. *Pharmacotherapy: A pathophysiologic approach*. 10th ed. New York: McGraw-Hill; 2017.
4. Raghavan D, Holley J. Conservative care of the elderly CKD patient: A practical guide. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2016;23(1):51-6.
5. Chuasuwan A, Praditpornsilpa K. Thailand renal replacement therapy annual report Thailand: The Nephrology Society of Thailand;2014 [Cited 2019 April 13]. Available from <http://www.nephrothai.org/en/trt-annual-report/332-annual-report-thailand-renal-replacement-therapy-2007-2014>
6. Stein H, Josef C, Brad A, Arne A, Neil P, Solfrid R, Hans H, Stian L, Jostein H. International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and ESRD risk. *J Am Soc Nephrol*. 2006;17:2275-84.
7. Sabanayagam C, Lim SC, Wong TY, Lee J, Shankar A, Tai S. Ethnic disparities in prevalence and impact of risk factors of chronic kidney disease. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25:2564-70.
8. Weifei Z, Wang Z, W. H. Wilson T, Stanley H. Gut microbe-generated TMAO from dietary choline is prothrombotic in subjects. *Circulation*. 2017;135(17):1671-3.
9. Guangping S, Zhongmin Y, Naiquan L, Xiaohui B, Rui Y, Xiaoxiao S, Beiru Z, Yanqiu W. Gut microbial metabolite TMAO contributes to renal dysfunction in a mouse model of diet-induced obesity. *Bio R communi*. 2017:964-70.

10. Punjathumjarern N, Wanchai A, Kaewboonsert D. Treatment decision-making process with continuous ambulatory peritoneal dialysis of patients with end-stage kidney disease, Phayao Hospital. *J Health Sci R*. 2019;13(2):1-10.
11. Cotran S, Kumar V, Fausto N, Robbins L, Abbas K. Robbins and cotran pathologic basis of disease. 7th ed. Michigan: Elsevier Saunders. 2005:515-25.
12. KDIGO 2012 Clinical practice guideline for the management of blood pressure in chronic kidney disease. *Kidney Inter Suppl*. 2013;3(1):1-150.
13. Dumrongkitchaiporn S, Sritara P, Kitiyakara C, Stitchantrakul W, Krittaphol V, Lolekha P, Cheepudomwit S, Yipintsoi T. Risk factors for development of decreased kidney function in a southeast asian population: A 12-year cohort study. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:791-9.
14. Chittinandana A, Chailimpamontree W, Chaloeiphap P. Prevalence of chronic kidney disease in Thai adult population. *J Med Assoc Thai*. 2006;89:S112-20.
15. Perkovic V, Cass A, Patel A, Suriyawongpaisal P, Barzi F, Chadban S, Macmahon S, Neal B. High prevalence of chronic kidney disease in Thailand. *Kidney Int*. 2008;73:473-9.
16. Ong-ajyooth L, Vareesangthip K, Khonputsra P, Aekplakorn W. Prevalence of chronic kidney disease in Thai adults: a national health survey. *BMC Nephrol*. 2009;10:35.
17. U.S. Renal Data System, USRDS 2013 Annual Data Report: Atlas of chronic kidney disease and end-stage renal disease in the United States, National institutes of health, National institute of diabetes and digestive and kidney diseases, Bethesda, MD. 2013.
18. Coresh J, Selvin E, Stevens L, Manzi J, Kusek J, Eggers P, Lente F, Levey A. Prevalence of chronic kidney disease in the United States. *J Am Med Assoc*. 2007;298:2038-47.
19. Ingsathit A, Thakkinstian A, Chaiprasert A, Sangthawan P, Gojaseni P, Kiattisunthorn K. Prevalence and risk factors of chronic kidney disease in the Thai adult population: Thai seek study. *Nephrol Dial Transplant*. 2010;25:1567-75.
20. Ibrahim H, Mondress M, Tello A, Fan Y, Koopmeiners J, Thomas W. An alternative formula to the Cockcroft-Gault and the modification of diet in renal diseases formulas in predicting GFR in individuals with type 1 diabetes. *J Am Soc Nephrol*. 2005;16:1051-60.

21. Thailand renal replacement therapy registry 2012 report. สมาคมโรคไตแห่งประเทศไทย [Cited 2015 April 24]. Available from <http://www.nephrothai.org/trt/trt-l.asp>
22. Dhanakijcharoen P, Sirivongs D, Aruyapitipan S, Chuengsaman P, Lumpaopong A. The “PD First” policy in Thailand: Three-year experiences (2008-2011) J Med Assoc Thai. 2011;94(4):S153-61.
23. Chadban S, Briganti E, Kerr P, Dunstan D, Welborn T, Atkins R. Prevalence of kidney damage in Australian adults: The AusDiab kidney study. J Am Soc Nephrol. 2003;14:131–8.
24. Grassmann A, Gioberge S, Moeller S, Brown G. ESRD patients in 2004: Global overview of patient numbers, treatment modalities and associated trends. Nephrol Dial Transplant. 2005;20:2587-93.
25. Anand S, Khanam M, Finkelstein F. Global perspective of kidney disease. In: Byham LD, Burrowes JD, Chertow GM, eds. Nutrition in kidney disease. 2nd ed. New York: Springer Science Business Media. 2014;11-33.
26. Andrew L, Josef C, Kline B, Bruce C, Kathy H, T. Alp I, Cynda J, Annamaria K, Paul K, John K, et al. K/DOQI Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: Evaluation, classification, and stratification. Am J Kidney Dis. 2002;39(2):S1-266.
27. Levey A, Stevens L, Schmid C, Zhang Y, Castrol A, Feldman H, Kusek J, Eggers P, Lente F, Greene T, Coresh J. A new equation to estimate glomerular filtration rate. Ann Intern Med. 2009;150:604-12.
28. อติพร อิงค์สาธิต, อธิรุท จียมจริยาภรณ์. คู่มือการจัดการดูแลผู้ป่วยโรคไตเรื้อรังระยะเริ่มต้น. สมาคมโรคไตแห่งประเทศไทย: โรงพิมพ์ยูนิเวนอุลตราไวโอเล็ต; 2555:144.
29. Nephrology society of Thailand. Thailand renal replacement therapy [internet]. 2015 [cited 2020 Jan 10]; Available from https://nephrothai.org_2015
30. Kanjanabuch T, Chancharoentana W, Katanetin P, Sritippyawan S, Praditpornsilpa K, Arinyapitipun S, Eiam-Ong S, Dhanakijcharoen P, Lumlertgul D. The incidence of peritoneal dialysis related Infection in Thailand: A nationwide survey. J Med Assoc Thailand. 2011;94(4):7-12.
31. Sima A, Stancu C, Simionescu M. Vascular endothelium in atherosclerosis. Cell Tissue Res. 2009;335(1):191-203.

32. Gomes B. Care of the patient undergoing radial approach heart catheterization: Implications for medical-surgical nurses. *Medsurg Nurs*. 2015;24(3):173-6.
33. Morton J. The interventional cardiac catheterization handbook. 3rd ed. Philadelphia: Saunders. An imprint of Elsevier Inc. 2013;38-62.
34. Thach N, Colombo A, Dayi H, Cindy L, Saito S. Practical handbook of advanced Interventional cardiology. 3rd ed. Oxford: Blackwell Futura. 2008;118-36.
35. Sun C. Cardio-ankle vascular index (CAVI) as an indicator of arterial stiffness. *Integrate blood pressure control*. 2013;6:27-38.
36. Roland A. Principles and usefulness of the cardio-ankle vascular index (CAVI): a new global arterial stiffness index. *Eur heart j*. 2017;19:B4-10.
37. Lidbury I, Murrell J, Chen Y. Trimethylamine N-oxide metabolism by abundant marine heterotrophic bacteria. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;2710-5.
38. Wilson T, Zeneng W, David K, Yuping W, Jennifer B, Brendan A, Xinmin S, Bruce L, Stanley H. Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease. *Circulation R*. 2015;116:448-55.
39. Dolphin C, Janmohamed A, Smith R, Shephard E, Phillips I. Missense mutation in flavin-containing mono-oxygenase 3 gene, FMO3, underlies fish-odour syndrome. *Nat Genet*. 1997;17:491-4.
40. Velasquez M, Ramezani A, Manal A, Raj D. Trimethylamine N-oxide: The good, the bad and the unknown. *Toxins*. 2016 Nov 8;8(11):326-37.
41. Manuel O, Manuela N, Christian S, Jonas O, Andreas H, Mirjam C, Christoph H, Claus H, Robert T, Werner Z, et al. Trimethylamine-N-oxide (TMAO) predicts fatal outcomes in community-acquired pneumonia patients without evident coronary artery disease. *Euro J of Inter Med*. 2016 Dec;(36):67-73.
42. Mingpakanee R. The role of small dense LDL in the pathogenesis of coronary artery disease. *J Med Tech Assoc*. 2018;46(3):6657-70.
43. Robert B. Diet and exercise in the management of hyperlipidemia. *Am Fam Physician*. 2010 May 1;81(9):1097-102.
44. Mary C, Shawn F. ชีวเคมี Biochemistry. ผู้แปลและเรียบเรียง คณาจารย์ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ:โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2554.

45. Durrington PN. Lipoprotein and their metabolism. In: Durrington PN. Editor. *Hyperglycemia: diagnosis and management*. 2nd ed. Oxford: Butterworth Heinemann. 1995:25-71.
46. Helander HF, Fandriks L. Surface area of the digestive tract - revisited. *Scand J Gastroenterol*. 2014;49(6):681-9.
47. Amornphimoltham P, Yuen PST, Star RA, Leelahavanichkul A. Gut Leakage of Fungal-Derived Inflammatory Mediators: Part of a Gut-Liver-Kidney Axis in Bacterial Sepsis. *Dig Dis Sci*. 2019;64(9):2416-28.
48. Panpetch W, Sawaswong V, Chanchaem P, Ondee T, Dang CP, Payungporn S, et al. Corrigendum: Candida Administration Worsens Cecal Ligation and Puncture-Induced Sepsis in Obese Mice Through Gut Dysbiosis Enhanced Systemic Inflammation, Impact of Pathogen-Associated Molecules From Gut Translocation and Saturated Fatty Acid. *Front Immunol*. 2020;11:613095.
49. Bhunyakarnjanarat T, Udornpompitak K, Saisorn W, Chantraprapawat B, Visitchanakun P, Dang CP, et al. Prominent Indomethacin-Induced Enteropathy in FcγRIIB Deficient lupus Mice: An Impact of Macrophage Responses and Immune Deposition in Gut. *Int J Mol Sci*. 2021;22(3).
50. Thim-Uam A, Surawut S, Issara-Amphorn J, Jaroonwitchawan T, Hiengrach P, Chatthanathon P, et al. Leaky-gut enhanced lupus progression in the FcγRIIb receptor-deficient and pristane-induced mouse models of lupus. *Sci Rep*. 2020;10(1):777.
51. Panpetch W, Somboonna N, Bulan DE, Issara-Amphorn J, Finkelman M, Worasilchai N, et al. Oral administration of live- or heat-killed *Candida albicans* worsened cecal ligation and puncture sepsis in a murine model possibly due to an increased serum (1→3)-beta-D-glucan. *PLoS One*. 2017;12(7):e0181439.
52. Issara-Amphorn J, Surawut S, Worasilchai N, Thim-Uam A, Finkelman M, Chindamporn A, et al. The Synergy of Endotoxin and (1→3)-beta-D-Glucan, from Gut Translocation, Worsens Sepsis Severity in a Lupus Model of FcγRIIb-Deficient Mice. *J Innate Immun*. 2018;10(3):189-201.
53. Mohammad S, Thiemermann C. Role of Metabolic Endotoxemia in Systemic Inflammation and Potential Interventions. *Front Immunol*. 2020;11:594150.

54. Camilleri M. Leaky gut: mechanisms, measurement and clinical implications in humans. *Gut*. 2019;68(8):1516-26.
55. Chanchaoenthana W, Wattanatorn S, Vadcharavivad S, Eiam-Ong S, Leelahavanichkul A. Agreement and Precision Analyses of Various Estimated Glomerular Filtration Rate Formulae in Cancer Patients. *Sci Rep*. 2019;9(1):19356.
56. Wang F, Zhang P, Jiang H, Cheng S. Gut bacterial translocation contributes to microinflammation in experimental uremia. *Dig Dis Sci*. 2012;57(11):2856-62.
57. Vaziri ND, Goshtasbi N, Yuan J, Jellbauer S, Moradi H, Raffatellu M, et al. Uremic plasma impairs barrier function and depletes the tight junction protein constituents of intestinal epithelium. *Am J Nephrol*. 2012;36(5):438-43.
58. Rydzewska-Rosolowska A, Sroka N, Kakareko K, Rosolowski M, Zbroch E, Hryszko T. The Links between Microbiome and Uremic Toxins in Acute Kidney Injury: Beyond Gut Feeling-A Systematic Review. *Toxins (Basel)*. 2020;12(12).
59. Tang WH, Wang Z, Kennedy DJ, Wu Y, Buffa JA, Agatista-Boyle B, et al. Gut microbiota-dependent trimethylamine N-oxide (TMAO) pathway contributes to both development of renal insufficiency and mortality risk in chronic kidney disease. *Circ Res*. 2015;116(3):448-55.
60. Barrett EL, Kwan HS. Bacterial reduction of trimethylamine oxide. *Annu Rev Microbiol*. 1985;39:131-49.
61. Arata H, Shimizu M, Takamiya K. Purification and properties of trimethylamine N-oxide reductase from aerobic photosynthetic bacterium *Roseobacter denitrificans*. *J Biochem*. 1992;112(4):470-5.
62. Roncal C, Martinez-Aguilar E, Orbe J, Ravassa S, Fernandez-Montero A, Saenz-Pipaon G, et al. Trimethylamine-N-Oxide (TMAO) Predicts Cardiovascular Mortality in Peripheral Artery Disease. *Sci Rep*. 2019;9(1):15580.
63. Stubbs JR, House JA, Ocque AJ, Zhang S, Johnson C, Kimber C, et al. Serum Trimethylamine-N-Oxide is Elevated in CKD and Correlates with Coronary Atherosclerosis Burden. *J Am Soc Nephrol*. 2016;27(1):305-13.
64. Hsu CN, Chang-Chien GP, Lin S, Hou CY, Lu PC, Tain YL. Association of Trimethylamine, Trimethylamine N-oxide, and Dimethylamine with Cardiovascular Risk in Children with Chronic Kidney Disease. *J Clin Med*. 2020;9(2).

65. Leelahavanichkul A, Huang Y, Hu X, Zhou H, Tsuji T, Chen R, et al. Chronic kidney disease worsens sepsis and sepsis-induced acute kidney injury by releasing High Mobility Group Box Protein-1. *Kidney Int.* 2011;80(11):1198-211.
66. Leelahavanichkul A, Yan Q, Hu X, Eisner C, Huang Y, Chen R, et al. Angiotensin II overcomes strain-dependent resistance of rapid CKD progression in a new remnant kidney mouse model. *Kidney Int.* 2010;78(11):1136-53.
67. Panpetch W, Hiengrach P, Nilgate S, Tumwasorn S, Somboonna N, Wilantho A, et al. Additional *Candida albicans* administration enhances the severity of dextran sulfate solution induced colitis mouse model through leaky gut-enhanced systemic inflammation and gut-dysbiosis but attenuated by *Lactobacillus rhamnosus* L34. *Gut Microbes.* 2020;11(3):465-80.
68. Hiengrach P, Panpetch W, Worasilchai N, Chindamporn A, Tumwasorn S, Jaroonwichawan T, et al. Administration of *Candida Albicans* to Dextran Sulfate Solution Treated Mice Causes Intestinal Dysbiosis, Emergence and Dissemination of Intestinal *Pseudomonas Aeruginosa* and Lethal Sepsis. *Shock.* 2020;53(2):189-98.
69. Xiao-Hua Z, Nancy O, Donna M. Statistical methods in diagnostic medicine. Wiley series in probability and statistics. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, Inc. 2011:193-228.
70. Zeneng W, Bruce L, Jennie H, Lillian D, Xin-Min Li, Stanley H. Measurement of trimethylamine-N-oxide by stable isotope dilution liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2014 Jun 15;455:35-40.
71. Beutler B. TLR4 as the mammalian endotoxin sensor. Toll-Like receptor family members and their ligands, Berlin Heidelberg: Springer. 2002;270:109-120.
72. Shafi T, Powe NR, Meyer TW, Hwang S, Hai X, Melamed ML, et al. Trimethylamine N-Oxide and Cardiovascular Events in Hemodialysis Patients. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28(1):321-31.
73. Dos Santos JP, Iobbi-Nivol C, Couillault C, Giordano G, Mejean V. Molecular analysis of the trimethylamine N-oxide (TMAO) reductase respiratory system from a *Shewanella* species. *J Mol Biol.* 1998;284(2):421-33.

74. Panpetch W, Kullapanich C, Dang CP, Visitchanakun P, Saisorn W, Wongphoom J, et al. Candida Administration Worsens Uremia-Induced Gut Leakage in Bilateral Nephrectomy Mice, an Impact of Gut Fungi and Organismal Molecules in Uremia. *mSystems*. 2021;6(1).
75. Glorieux G, Gryp T, Perna A. Gut-Derived Metabolites and Their Role in Immune Dysfunction in Chronic Kidney Disease. *Toxins (Basel)*. 2020;12(4).



ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายสมพงศ์ บุญให้
วัน เดือน ปี เกิด	03 สิงหาคม 2524
สถานที่เกิด	อำเภอแกลง จังหวัดระยอง
วุฒิการศึกษา	พ.ศ. 2547 วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ
ที่อยู่ปัจจุบัน	1871 ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330
ผลงานตีพิมพ์	Boonhai S, Aiemumpron K, Tingtoy U. Production of a new anti-M monoclonal reagent using human hybridoma technology. Chula Med J. 2016;60(1):101-13 Sompong Boonhai, Udom Tingtoy. Animal cell culture: History, basic and application in blood bank service. Chula Med Bull. 2019(1);543-53
รางวัลที่ได้รับ	ได้รับรางวัลชนะเลิศอันดับ 1 การประกวด Poster Presentation เรื่อง การสร้างเซลล์สายพันธุ์ Anti-M ด้วยวิธี Human monoclonal hybridoma technique ในงานประชุมวิชาการงานบริการโลหิตระดับชาติ ครั้งที่ 23 ประจำปี 2558